

FABIANO COMIN

**PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA AGENTES INFECCIOSOS EM
PACIENTES COM DOENÇA CORONARIANA**

FLORIANÓPOLIS

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Pesquisa de anticorpos contra agentes infecciosos em pacientes com
doença coronariana

**Dissertação apresentada por Fabiano Comin para obtenção do Grau de Mestre
em Farmácia**

Orientador: Prof^o. Dr. Carlos Roberto Zanetti

Co-Orientador: Prof^o. Dr. Roberto Henrique Heinisch

FLORIANÓPOLIS

2003

“A SOCIEDADE É O MAIOR EXPERIMENTO DA HUMANIDADE”

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Moacir e Dalva e meus irmãos, Fabrício, Fábio, Fábio e Fernando.

Aos jovens e corajosos estudantes que fazem pesquisa em seres humanos.

Ao equilíbrio entre as forças da Natureza, que permite a existência da vida.

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais pela oportunidade de viver e aprender.
- Ao Dr. Zanetti, um grande amigo pesquisador, que tive o privilégio de ter como orientador e como guia nos caminhos da ciência. Pela sua paciência, dedicação e confiança.
- Ao Dr. Heinisch uma raridade entre os médicos não só pela coragem de fazer pesquisa em seres humanos, mas também pela paciência e respeito com que trata seus pacientes, por toda ajuda na elaboração desse estudo e na análise estatística dos resultados.
- Aos professores de Imunologia (Sônia, Hermênio, Célia e Edelson) e parasitologia (Neri, Orlando, Marília, Mário, Edmundo e Carlos) da UFSC, pelo convívio ao longo desses anos que passei no MIP.
- Aos companheiros (as) de laboratório Juliano, Kleber, Jean, Juliana, Gabriela, Alexandre, Dani, Sibeli, Rodrigo, Rúbia, Priscila, Mônica, Thaís, Luciana.
- Ao pessoal do setor de Cardiologia do H.U., Luíz, Simone B., Simone, Dani, Jaque, Rodrigo.
- A Léia e a Fabiana pela ajuda nas coletas das amostras.
- A minha namorada Ceyla pelo apoio nos momentos difíceis.

- Ao financiamento da FUNCITEC e ao CNPq pela bolsa concedida nos últimos seis meses do Mestrado.
- Aos pacientes voluntários deste estudo, meus sinceros reconhecimentos por colaborarem com a pesquisa em nosso país.
- As pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	II
LISTA DE ABREVIATURAS.....	III
RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Disfunção Endotelial na Aterosclerose.....	3
1.2 LDL e Células Espumosas.....	4
1.3 Anatomia da Placa Aterosclerótica.....	5
1.4 Instabilização da Placa Aterosclerótica.....	6
1.5 Inflamação e Degradação da Capa Fibrosa.....	7
1.6 Citocinas Proteína C-reativa e Aterosclerose.....	8
1.7 Infecção e Aterosclerose.....	9
2 OBJETIVOS.....	15
3 PACIENTES E MÉTODOS.....	16
3.1 Considerações Éticas.....	16
3.2 Pacientes.....	16
3.3 Critérios de Inclusão dos Pacientes.....	16
3.4 Critérios de Exclusão dos Pacientes.....	17
3.5 Coleta das Amostras de Sangue.....	17
3.6 Processamento das Amostras de Soro.....	18

3.7 Dosagem dos Marcadores Infecciosos.....	18
3.7.1 Dosagem de Anticorpos contra HSV-1, CMV, <i>H. pylori</i> , <i>C. pneumoniae</i> e <i>M. pneumoniae</i>	19
3.7.2 Procedimento para Dosagens de Anticorpos IgM e IgG contra HSV-1, CMV e <i>H. pylori</i>	20
3.7.3 Procedimento para Dosagem de Anticorpos IgM contra <i>C. pneumoniae</i> e <i>M. pneumoniae</i>	21
3.7.4 Procedimento para determinação de títulos de anticorpos IgG contra <i>C. pneumoniae</i> e <i>M. pneumoniae</i>	22
3.8 Cálculo para determinar soropositividade de IgM contra HSV-1, CMV, <i>H. pylori</i>, <i>C. pneumoniae</i>, <i>M. pneumoniae</i> e IgG contra HSV-1.....	23
3.9 Cálculo para títulos de IgG contra CMV, <i>H. pylori</i> , <i>C. pneumoniae</i> e <i>M. pneumoniae</i>	23
3.10 Análise Estatística.....	24
3.11 Lista de Reagentes.....	25
4 RESULTADOS.....	27
4.1 Características Basais dos Grupos Estudados.....	27
4.2 HSV-1.....	27
4.3 Citomegalovirus.....	28
4.4 <i>Helicobacter pylori</i>	36
4.5 <i>Chlamydia pneumoniae</i>	39
4.6 <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	42
4.7 Carga de Patógenos.....	44
5 DISCUSSÃO.....	47

5.1 HSV-1.....	48
5.2 Citomegalovirus.....	51
5.3 <i>Helicobacter pylori</i>	54
5.4 <i>Chlamydia pneumoniae</i>	57
5.5 <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	59
5.6 Carga de Patógenos.....	62
6 CONCLUSÕES.....	65
7 REFERÊNCIAS.....	66
8 ANEXO.....	79
9 APÊNDICE.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mortalidade proporcional por causas selecionadas no Brasil 1980-1999.....	2
Figura 2: <i>Odds ratio</i> para DAC em pacientes soropositivos (IgG) para cada patógeno.....	30
Figura 3: Títulos de anticorpos contra CMV nos diferentes grupos.....	31
Figura 4: <i>Odds ratio</i> para DAC em pacientes com altos títulos de anticorpos (IgG) para cada patógeno.....	34
Figura 5: Títulos de anticorpos contra <i>H. pylori</i> nos diferentes grupos.....	37
Figura 6: Títulos de anticorpos contra <i>C. pneumoniae</i> nos diferentes grupos.....	40
Figura 7: Títulos de anticorpos contra <i>M. pneumoniae</i> nos diferentes grupos.....	44
Figura 8: <i>Odds ratio</i> para DAC em pacientes soropositivos (IgG) para vários patógenos (carga de Patógenos).....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Mortalidade Proporcional por Grupos de Causas Seleccionadas.....	2
Tabela 2: Porcentagem de soropositividade contra cada patógeno nos diferentes grupos....	27
Tabela 3: Associação entre soropositividade (IgG) para cada patógeno e DAC.....	29
Tabela 4: Associação entre títulos de anticorpos IgG contra cada patógeno e DAC.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	angina estável
AI	angina instável
C	controle
CI	confidence interval
<i>C. pneumoniae</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
CMV	Cytomegalovirus
DAC	doença arterial coronariana
HSV-1	<i>Herpes simplex virus – 1</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IFN-γ	interferon - gamma
IL-1	interleucina – 1
IL-6	interleucina– 6
IL-10	interleucina - 10
ICAM-1	molécula de adesão celular - 1
LDL	lipoproteína de baixa densidade
<i>M. pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
PCR	reação em cadeia da polimeraze
r.p.m.	rotações por minuto
TNF-α	fator de necrose tumoral – alfa
UI	unidades internacionais
VCAM-1	molécula de adesão celular vascular - 1

RESUMO

Várias evidências sugerem que existe ligação entre infecções e doenças coronarianas. Estudos histopatológicos detectaram antígenos e material genético de vários microorganismos em lesões ateroscleróticas. Outros autores demonstraram associação entre anticorpos contra agentes infecciosos e doença arterial coronariana. Entretanto, o envolvimento de agentes infecciosos com aterosclerose precisa ser melhor esclarecido. O objetivo do presente estudo, foi avaliar títulos e presença de anticorpos (IgG, IgM) específicos contra vírus Herpes-1 (HSV-1), Citomegalovírus (CMV), *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) e *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*), no soro de 60 pacientes [40 com doença arterial coronariana (DAC) e 20 controles(C)], através de ELISA. Pacientes soropositivos (IgG) para *Mycoplasma pneumoniae* e aqueles com títulos mais elevados tiveram risco maior para ter DAC (*odds ratio*=20,4 IC 95% 1,97-507,47 e 13,0 IC 95% 1,65-131,6; respectivamente). Entre as diferentes síndromes de DAC, observamos que pacientes com angina instável apresentaram maior soropositividade de IgM contra *H. pylori*, que pacientes com angina estável ($P=0,03$), sugerindo um envolvimento entre infecção aguda por esse agente e a manifestação aguda da DAC. Os pacientes com angina estável apresentaram maior soropositividade de IgG contra *M. pneumoniae* que os controles ($P=0,001$). Esse fato sugere um envolvimento de infecção crônica por *M. pneumoniae* e início da DAC. Nenhuma associação foi observada entre anticorpos (IgM ou IgG) contra HSV-1, CMV e *C. pneumoniae*, e DAC. Quando avaliou-se a associação entre o número de patógenos aos quais o indivíduo tinha sido exposto (carga de patógenos) e DAC, não foi encontrado resultados significativos (*odds ratio*=3,05 IC 95% 0,67-15,73). Em resumo, esse estudo demonstrou associação entre infecção aguda por *H. pylori* (indicada pela presença de IgM) e angina instável e aumento do risco para ocorrer DAC nos pacientes com infecção crônica, ou passada por *M. pneumoniae* (indicada pela presença de IgG).

Palavras chave: Aterosclerose, Infecção, *Mycoplasma pneumoniae*, *Helicobacter pylori*.

ABSTRACT

There is some evidence for a pathogenic role for infections in coronary artery disease (CAD). Antigens and genetic material of several pathogens have been revealed in atherosclerotic lesions. Some authors have reported association within antibodies directed to infectious agents and CAD while other studies reported contradictory results. In an attempt to verify this association in local conditions, the present study reports seropositivity (IgG and IgM) and antibody titres (IgG) against *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, Herpes Virus type 1 (HSV-1) and Citomegalovirus, in serum samples from patients (n=60) with unstable and stable angina (UA and SA, respectively) and a control group of healthy volunteers, matched by sex and age. The seropositivity for IgM against *H. pylori* was significantly higher in the UA group when compared to AS (p=0.03), but not with C group (p>0.05). There were no differences against the other agents tested. Regarding to IgG seropositivity, patients with CAD (US+AS) have significant higher rates (p=0.002) than C, only when IgG against *M. pneumoniae* was tested. The risk for CAD was also extremely significant (odds ratio=20.4; CI 95% 1.97-507.47) for patients presenting those antibodies. In addition, patients with higher titres had an elevated risk for CAD (odds ratio = 13.0; CI 95% 1.65-131.6). The number of pathogens which patients were previously exposed, considered as the total pathogen burden, was not associated with the risk for CAD (odds ratio=0.85, 0.90, and 3.95 for 3, 4 and 5 pathogens, respectively). In conclusion, the present study demonstrates association within acute *H. pylori* infection and UA (indirectly revealed by the presence of IgM) and ancient or chronic *M. pneumoniae* infection and risk for CAD (presence of IgG).

Keywords: Atherosclerosis, infection, *Mycoplasma pneumoniae*, *Helicobacter pylori*.

1 - INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares, representam a principal causa de morte nos países ocidentais, sendo responsáveis por aproximadamente 45% das mortes dessa população (ROBERTS *et al.* 1995, p.580). No Brasil, elas são responsáveis por 300.000 mortes por ano, o que corresponde a 820 óbitos por dia, 34 por hora ou um evento fatal a cada dois minutos. Além da elevada incidência e prevalência, o custo sócio econômico também é significativo, com altas taxas de mortalidade e morbidade. Além disso, é a principal causa de gastos em assistência médica do Sistema Único de Saúde (SUS), consumindo cerca de 16,2% do total dos gastos. (LOTUFO, 1996, p.541). O acompanhamento dos dados levantados pelo Ministério da Saúde do Brasil mostram um aumento da mortalidade proporcional devido às doenças do aparelho circulatório, conforme mostrado na Figura 1. Em Santa Catarina especificamente, o panorama não é muito diferente da média nacional (Tabela 1).

Tais números nos mostram que esse problema continua sendo um desafio constante aos médicos e pesquisadores, dispendioso ao governo e de um impacto humano considerável.

Dentre as enfermidades cardiovasculares a doença isquêmica do coração e as doenças cerebrovasculares são as que mais freqüentemente levam a óbito, ambas resultantes do processo aterosclerótico. Nos países em desenvolvimento, apesar de dados estatísticos ainda muito limitados, os mesmos sugerem que o aumento na incidência da doença coronariana, acompanha a aquisição dos hábitos de vida da civilização ocidental (GUIMARÃES, 1992, p.5).

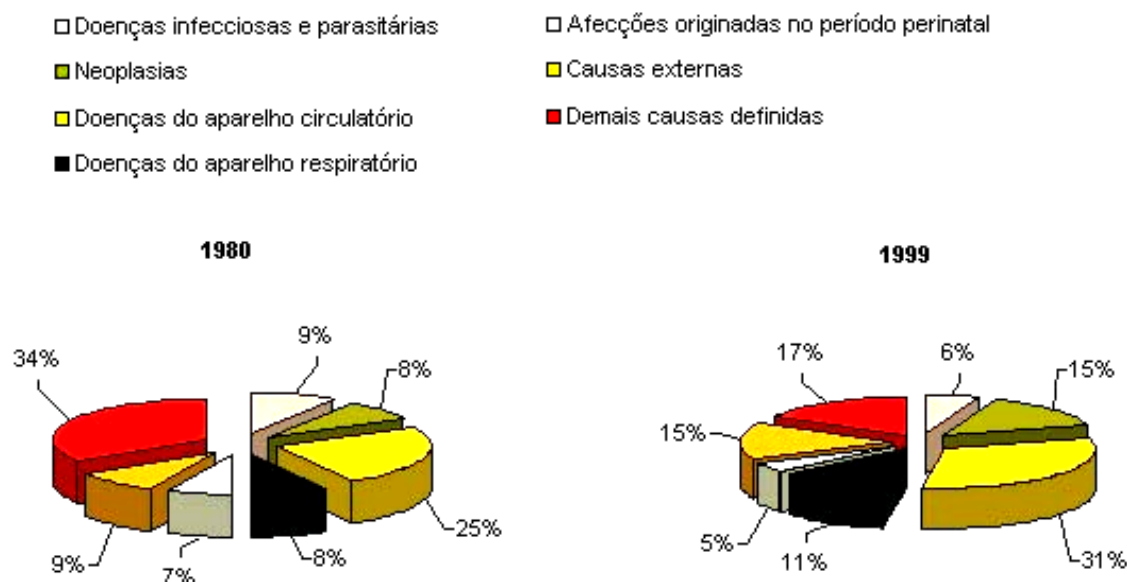


Figura 1: Mortalidade Proporcional por Causas Seleccionadas no Brasil – 1980 –1999.

Fonte: Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde – Funasa/Centro Nacional de Epidemiologia – Cenepi. Sistema de Informações sobre Mortalidade.

Figura adquirida no *site* do Ministério da Saúde (<http://portal.saude.gov.br/aplicacoes/anuario2001/mortalt10.1.x1x>)

(1) refere-se à porcentagem de óbitos em cada grupo de causas sobre o total de óbitos.

Tabela 1: Mortalidade Proporcional por Grupos de Causas Seleccionadas (porcentagem)

Regiões do Brasil e Unidades da Federação, 1999.

Brasil e Regiões	Doenças Infecciosas e Parasitárias	Neoplasias	Doenças do Aparelho Circulatório	Doenças do Aparelho Respiratório
BRASIL	5,8	14,5	32,3	11,2
Norte	7,7	11,4	23,7	10,5
Nordeste	7,8	10,9	30,0	10,0
Sudeste	5,4	15,0	33,2	11,5
Sul	4,1	18,1	35,2	12,1
Santa Catarina	4,7	18,0	33,8	11,2
Centro-Oeste	6,7	13,7	29,4	9,9

Fonte: Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde –Funasa/Centro Nacional de Epidemiologia – Cenepi. Sistema de Informações sobre Mortalidade.

Tabela adquirida no *site* do Ministério da Saúde (<http://portal.saude.gov.br/aplicacoes/anuario2001/mortalt10.1.x1x>)

A patogênese da aterosclerose foi inicialmente estudada no século XIX, por Von ROKITANSKY, 1852, p.261, que publicou a “hipótese da incrustação”, segundo a qual o processo inicial de lesão vascular ocorria através do espessamento da camada íntima com deposição de fibrina e consequentemente organização do fibroblasto com deposição secundária de lipídios. Posteriormente, VIRCHOW, 1856, p.458, propôs a “hipótese lipídica”, na qual postulava que o acúmulo de lipídios na parede arterial ocorria por um desequilíbrio entre a transudação dos lipídios da corrente sanguínea e os mecanismos de remoção dos mesmos. Atualmente a hipótese mais aceita foi elaborada por ROSS e GLOMSET, 1976, p.369, que integrou as duas antigas hipóteses e postulou um complexo mecanismo de resposta à lesão como fator inicial para o desenvolvimento da placa aterosclerótica, que teria características de um processo inflamatório crônico.

1.1 - Disfunção Endotelial na Aterosclerose

ROSS, 1999, p.115, sugere que o processo da aterosclerose inicia-se com a agressão ao endotélio por fatores diversos como stress mecânico e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) oxidada, o que gera uma alteração funcional mas não morfológica nas células endoteliais. Essa disfunção endotelial resultante da injúria, leva a uma resposta compensatória que altera as propriedades homeostáticas normais do endotélio. A alteração funcional de células endoteliais pode se manifestar de maneiras distintas (GLASSER *et al.*, 1996, p.379) como maior aprisionamento de Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) no espaço subendotelial (MORA *et al.*, 1997, p.143), indução da expressão de qualidades e quantidades diferentes de moléculas de adesão e secreção de citocinas relacionadas com migração e proliferação celular (ROSS e GLOMSET, 1976, p.369; BADIMON *et al.*, 1993, p.3).

A molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1), possui um papel importante nos estágios iniciais de formação da placa aterosclerótica (LIBBY, 1997, p.523) e foi demonstrado por RIDKER *et al*, 1988, p.88, aumento no risco para ocorrer infarto agudo do miocárdio em pacientes com níveis elevados de molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1).

1.2 - LDL e Células Espumosas

O transporte de LDL da corrente sangüínea para o espaço subendotelial, é um processo que pode ocorrer de forma passiva, diretamente proporcional à sua concentração no sangue (SCHWENKE e CAREW, 1989, p.895), ou por receptores, ou através de pinocitose (GIANNINI, 1998, p.7).

A primeira etapa da oxidação da LDL no espaço subendotelial ocorre na sua porção lipídica, por meio de produtos oxidativos produzidos pelas células da parede arterial, como endotélio, células musculares lisas e macrófagos (WITZTUM *et al.*, 1991, p.785 e WITZTUM, 1994, p.793; PARTHASARATHY, 1994, p.163). Nesse estado essa molécula pode induzir aumento na expressão de moléculas de adesão e proteínas quimiotáticas; como a proteína quimiotática para monócitos (MCP-1) (BERLINER *et al.*, 1990, p.1260). A segunda fase de oxidação ocorre quando a porção proteica da LDL torna-se oxidada e essa molécula passa a ser reconhecida por receptores “scavenger” na superfície dos macrófagos (KODAMA *et al*, 1990, p.531; ENDEMANN *et al*, 1993, p.118).

Macrófagos podem reconhecer a LDL natural através de seus receptores “B” e “E”, bem como outras lipoproteínas que contenham apolipoproteínas B-100 ou E. O número de receptores disponíveis para internalização de lipoproteínas é regulado pela concentração de colesterol no citoplasma, por um mecanismo de retroalimentação negativa (CHARO, 1992, p.335). Os receptores “scavenger” não possuem esse mecanismo de retroalimentação negativa (BROWN *et*

al., 1983, p.233), portanto não são capazes de regular a quantidade de lipoproteínas fagocitadas pelos macrófagos. Estes tornam-se ricos em conteúdo lipídico e originam as células espumosas, que são características da estria gordurosa, a lesão mais precoce reconhecida do início da aterosclerose (ROSS, 1999, p.115). Essas alterações que ocorrem com a LDL aprisionada foram propostas na década de 80, e baseiam a “hipótese oxidativa” da aterogênese, segundo a qual a LDL oxidada é importante e possivelmente obrigatória na patogênese da lesão aterosclerótica. Entre as alterações funcionais celulares causadas pela presença de LDL oxidada no interior da parede arterial, podemos destacar a produção de Interleucina-1 por macrófagos e células endoteliais. Essa citocina tem um papel importante no desenvolvimento da placa aterosclerótica por ser capaz de estimular migração e proliferação de células musculares lisas da camada média arterial. Estas ao migrarem passam a produzir citocinas, fatores de crescimento e também componentes da matriz extracelular, que formará parte da capa fibrosa (WITZTUM, 1994, p.793).

1.3 - Anatomia da Placa Aterosclerótica

A formação da placa aterosclerótica é de etiologia multifatorial e decorrente de um processo inflamatório crônico da parede arterial, com depósitos de substâncias gordurosas, colesterol, células espumosas, macrófagos, linfócitos, plaquetas, fibrina, componentes da matriz e Cálcio (MORAIS, 1988, p.568).

A evolução da lesão aterosclerótica, da estria gordurosa até placa fibrosa é bastante lenta e pode iniciar ainda na infância ou em adultos jovens (STARY, 1989, p.119). A placa aterosclerótica é formada por dois componentes estruturais diferentes: um núcleo lipídico e a capa fibrosa. Essa capa fibrosa é formada basicamente por células musculares lisas, células inflamatórias e matriz extracelular (colágeno, elastina, proteoglicanos e microfibrilas proteicas),

podendo atingir 70% do tamanho de uma placa dita estável (KRAGEL *et al.*, 1989, p.1747; ROSENSCHEIN *et al.*, 1982, p.953). O núcleo lipídico é hipocelular e rico em lipídios extracelulares, principalmente cristais e ésteres de colesterol. O conteúdo desse núcleo é altamente trombogênico e quando em contato com a corrente sangüínea, por ruptura da capa fibrosa, estimula os fenômenos de adesão e agregação plaquetária, ativação dos fatores de coagulação, levando a formação de trombo (NETO e CHAGAS, 1989, p.100); que poderá obstruir parcialmente ou totalmente a artéria determinando a evolução clínica do paciente.

1.4 - Instabilização da Placa Aterosclerótica

Estudos recentes indicam que a estenose severa não é a causa da maioria dos eventos coronarianos agudos (LEAVY *et al.*, 1988, p.56). Uma importância maior têm sido dada as placas menos obstrutivas, porém mais vulneráveis, caracterizadas por uma fina capa fibrosa, grande núcleo lipídico, infiltração intensa de células como macrófagos e linfócitos, e pequena quantidade de células musculares lisas (LIBBY *et al.*, 1998, p.14).

Os mecanismos que levam uma lesão aterosclerótica crônica estável passar a um estágio no qual a placa aterosclerótica sofre ruptura da capa fibrosa e a lesão passe a se denominar ativa; foram melhores compreendidos através de estudos sobre biologia vascular; estrutura da placa, participação da inflamação, processos relacionados a degradação da matriz extracelular e atividade pró-trombótica (FUSTER e LEWIS, 1994, p.2126).

Os eventos coronarianos agudos são geralmente desencadeados pela ruptura da capa fibrosa e subsequente formação de trombo. Estudos histopatológicos definiram características estruturais específicas nas placas instáveis relacionadas ao enfraquecimento da matriz extracelular em pontos de pressão mecânica aumentada (ARROY, 1999, p.369). RICHARDSON, DAVIES e BORN, 1989, p.941, observaram que nas placas com pouco conteúdo lipídico, a

pressão exercida pelo fluxo sanguíneo é maior na região central da placa; e nas placas com núcleo lipídico mais volumoso, o ponto de maior pressão se localiza na região denominada de “ombro da placa”, onde a capa fibrosa encontra o endotélio normal.

1.5 - Inflamação e Degradação da Capa Fibrosa

A capa fibrosa de placas rotas geralmente apresenta-se infiltrada não só por macrófagos ativados, indicando inflamação no local da ruptura (RICHARDSON *et al.*, 1989, p.941), mas também por linfócitos T, atraídos pelas moléculas de adesão expressadas no endotélio (VAN DER WAL *et al.*, 1994, p.36). Esses linfócitos geralmente encontram-se localizados na região do “ombro da placa”, que é a região mais propensa a ruptura (HANSSON, 1993, p.38). A citocina interferon- γ produzida por linfócitos Th1, inibe a capacidade das células musculares lisas de sintetizarem colágeno, um componente estrutural importante da capa fibrosa (HANSSON *et al.*, 1988, p.712).

Os macrófagos podem degradar a matriz extracelular através da fagocitose e/ou pela produção de metaloproteinases, que são enzimas capazes de digerir quase todas as substâncias presentes na matriz extracelular, podendo levar ao enfraquecimento da capa fibrosa e predispor-la a ruptura (MATRISIAN, 1992, p.455). Essas enzimas funcionam em um pH neutro no espaço extracelular onde são liberadas como pró-enzimas (DELLERY, McEVAN e HENNEY, 1992, p.863). Até o momento foram identificadas doze enzimas diferentes cada uma com seu substrato preferencial.

Um estudo feito por MORENO *et al.*, 1994, p.775, demonstrou que a infiltração de macrófagos é significativamente maior em placas responsáveis por síndromes coronárias agudas que nas responsáveis por angina estável.

Na patogênese da aterosclerose o tipo de resposta imunológica que está envolvida é a resposta celular, que envolve basicamente o sistema fagocitário mononuclear e linfócitos (ROSS, 1999, p.115).

1.6 - Citocinas, Proteína C-reativa e Aterosclerose

Os sistemas de sinalização da resposta imune efetuam a complicada tarefa de comunicação intercelular na injúria e/ou infecção. Um desses mecanismos ocorre através de proteínas solúveis produzidas não só por células do sistema imunológico, mas também por células endoteliais, fibroblastos e células musculares lisas (GHOSH *et al.*, 1998, p.225). Essas proteínas solúveis são chamadas de citocinas e possuem algumas características em comum como ação autócrina (quando atua na própria célula que a produziu), parácrina (quando atua em uma célula vizinha à célula produtora) e endócrina (quando age em um tecido distante do local de produção); efeito redundante (citocinas diferentes tendo o mesmo efeito na mesma célula), sinergismo (uma citocina pode aumentar o efeito de outra em determinada célula) e efeito pleiotrópico (a mesma citocina pode ter diferentes efeitos em diferentes células) (DELARCHE *et al.*, 1999, p.475). Essas proteínas participam de eventos que incluem a apresentação antigênica, diferenciação a nível de medula óssea, quimiotaxia, ativação celular, expressão de moléculas de adesão e as respostas de fase aguda e crônica. A natureza das citocinas secretadas determina o tipo de resposta imunológica que pode ser humoral, celular ou alérgica (GELLER, P. e GELLER, M., 1997, p.97).

Além das características citadas acima, essas proteínas são produzidas por um curto período de tempo após a ativação celular e possuem atividade em concentrações muito baixas (picomolar); algumas formas são expressadas na membrana plasmática e outras secretadas para a circulação (DELARCHE *et al.*, 1999, p.475). No endotélio, a síntese desses mediadores leva a

um aumento na expressão de moléculas de adesão na superfície de células vasculares endoteliais no sítio de inflamação (LUSCINSKAS, 1991, p.1617; DUSTIN *et al.*, 1986, p.245). Em condições normais há um forte controle na expressão de moléculas de adesão e seus contra-receptores; uma falha desse controle, que pode ser induzido por uma disfunção endotelial, contribui para o desenvolvimento de reações inflamatórias (RICHARDSON, DAVIES e BORN, 1989, p.941). Os eventos que se seguem após injúria tecidual são referentes a dilatação vascular, alteração da permeabilidade capilar, exudação de líquidos e proteínas, acúmulo de células e de tecido de granulação, mediados pela expressão de genes de citocinas e de fatores de transcrição (KUSHNER, 1998, p.191).

Algumas das citocinas produzidas durante o processo inflamatório agudo, possuem a capacidade de induzir a produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, entre essas citocinas se destaca a IL-6 (ROIT, BROSTOF e MALE, 2000). Entre as proteínas de fase aguda, a proteína C-reativa possui um grande valor informativo para diagnóstico, terapia e controle da evolução dos processos inflamatórios e das doenças a eles relacionados (HIND e PEPYS, 1984, p.112; LEUWEN e RIJSWIJK, 1994, p.531). O valor prognóstico de citocinas inflamatórias e proteína C-reativa na doença coronariana já foi demonstrado anteriormente (BIASUCCI *et al.*, 1996, p.874; RIDKER, *et al.*, 2000, p.1767; REBUZZI, 1988, p.715).

1.7 - Infecção e Aterosclerose

Os fatores de risco convencionais para doença cardiovascular não explicam a grande proporção de casos dessa doença na população em geral (GARCIA *et al.*, 2001, p.435). As investigações nessa área fornecem informações sobre a relação entre uma série de condições patológicas, como aumento na concentração sanguínea de lipoproteína(a), fibrinogênio, proteína C-reativa, homocisteína, citocinas (como a Interleucina-6 e o fator de necrose tumoral- α) ou a

deficiência de estrógenos, com a doença coronariana (D'ANGELO, 1997; RIDKER, P.M., 1998, p.88; GILLIGAN, QUYYUMI e CANNON, 1994, p.2545; BIASUCCI *et al.*, 1996, p.874).

A associação entre infecção e aterosclerose tem sido explorada em estudos soropidemiológicos e os agentes identificados por diferentes métodos incluindo cultura, imunohistoquímica, reação em cadeia da polimerase (PCR) e microscopia eletrônica, em lesões ateroscleróticas (*apud* LEINONEN e SAIKKU, 2002, p.11). Existem também especulações sobre a possibilidade de certas infecções virais e bacterianas, em células endoteliais e musculares lisas, iniciarem o processo inflamatório na parede arterial do vaso; assim, infecções seriam consideradas como um possível novo marcador de risco para doença cardiovascular, devido a seus efeitos sobre os processos inflamatórios de caráter local ou sistêmico (GARCIA *et al.*, 2001, p. 435).

A primeira evidência em experimentos com animais da associação entre infecção viral e aterosclerose foi relatada nos anos 70, através de um estudo em galinhas “germ-free” que desenvolveram aterosclerose após infecção com herpes vírus de aves. Esse resultado foi encontrado nos animais dos grupos tratados com dieta rica e pobre em lipídios (FABRICANT *et al.*, 1978, p.335).

Porém, a possível ligação entre agentes infecciosos e aterosclerose, foi relatada algumas décadas antes, no início do século XX, por KLOTZ e MANNINIG, 1912, p.211, que observaram relação entre aterosclerose precoce em animais e humanos, na existência de infecções concomitantes por vários patógenos. Nesse mesmo período, OSLER, 1908, p.429, escreveu sobre a ligação que poderia existir entre infecção aguda e aterosclerose e no início dos anos 50, PATERSON e COTTRAL, 1950, p.699, publicaram suas observações sobre uma forte associação entre aterosclerose e o vírus da doença Marek, um Herpesviridae responsável por causar linfomas de células T.

Atualmente existem evidências que outros vírus da família Herpes, como Citomegalovirus (CMV) (BLAMKLENBERG *et al.*, 2001, p.2915) e HSV-1 (YAMASHIROYA *et al.*, 1988, p.21) podem contribuir para patogênese da aterosclerose. Um dos primeiros estudos sobre associação de CMV com aterosclerose foi realizado por MELNICK *et al.*, 1987, p.644, que demonstraram presença de antígenos de Citomegalovirus em células musculares lisas de pacientes submetidos a cirurgia vascular.

A proposta da relação bacteriana com aterosclerose foi reforçada por SAIKKU *et al.*, 1988, p.983, que demonstraram através de associação sorológica, níveis elevados de anticorpos IgG e IgA contra *Chlamydia pneumoniae* em pacientes com diagnóstico de infarto agudo do miocárdio e doença coronariana crônica, sugerindo que infecção crônica pode ter alguma influência nas manifestações clínicas da doença coronariana. Estes achados foram confirmados posteriormente por estudos histopatológicos que detectaram a presença desta bactéria em placas ateroscleróticas de carótida (CHIU *et al.*, 1997, p.2144) e coronária (HIGUCHI, 2000, p.1023).

Outras bactérias tem sido relacionadas com aterosclerose. Um estudo feito por MENDALL *et al.*, 1994, p.437, relatou soropositividade para *Helicobacter pylori* duas vezes mais comum em pacientes com doença coronariana que em controles e HORNE *et al.*, 2000, p.321, demonstraram valor preditivo de soropositividade de IgA contra *Mycoplasma pneumoniae*, para doença coronariana.

A seguir uma breve descrição sobre os agentes infecciosos estudados nesse trabalho:

Herpes simplex-1 – O HSV-1 é um vírus pertencente a Família Herpesviridae, que possui dupla fita de DNA. Sua distribuição é mundial, ocorre em países desenvolvidos e em países em desenvolvimento. Estima-se que um terço da população mundial tenha infecção recorrente por esse vírus e por ser raramente fatal, um grande reservatório existe na comunidade. A infecção por esse vírus resulta em lesão vesiculosa epitelial na região bucal, em pessoas susceptíveis. O

contágio acontece através do contato íntimo entre pessoas, quando a lesão está manifesta. A infecção tem características crônicas, alternando estágios de latência e de manifestação clínica (CECIL- WYNGAARDEN, SMITH e BENNETT, 1992, p.1831).

CMV – também é um vírus que pertence a Família Herpesviridae e possui dupla fita de DNA. Sua distribuição é mundial. Em países menos desenvolvidos a infecção ocorre universalmente na infância, provavelmente em um curto período de tempo após o parto, e em países em desenvolvimento a infecção ocorre gradualmente através da infância, adolescência e vida adulta. A infecção geralmente é assintomática, em imunodeprimidos pode causar febre, esplenomegalia, hepatite, hiperplasia linfóide. Os maiores problemas ocorrem quando a mulher grávida se infecta e passa o vírus para o feto, o que pode resultar em retardo mental, perda da visão e/ou audição, trombocitopenia com púrpura ou anemia hemolítica. A transmissão está associada ao contato interpessoal e o vírus pode ser encontrado na saliva, urina, sangue, sêmen, leite ou secreções uterinas. A infecção tem características crônicas podendo ser persistente, latente ou reativada (CECIL- WYNGAARDEN, SMITH e BENNETT, 1992, p.1831).

Helicobacter pylori – é uma bactéria gram negativa em forma de espiral presente no trato gastrointestinal. Essa bactéria está associada a uma série de doenças gastrointestinais como a gastrite, úlcera gástrica e duodenal, adenocarcinoma gástrico e linfoma. A presença desse microrganismo acontece em 90-95% dos casos de úlcera duodenal e 60-90% dos casos de úlcera gástrica (PEREZ, *et al.*, 1991, p.642). Estudos têm demonstrado que a eliminação desse agente infeccioso, por terapia de antibióticos, está correlacionada com desaparecimento dos sintomas e cura da doença (RUAWS e TYTGAT, 1990, p.1233).

Chlamydia pneumoniae – é uma bactéria intracelular obrigatória, presente no trato respiratório, também conhecida como Chlamydia TWAR. Sendo uma bactéria amplamente distribuída pelo mundo, estima-se que a prevalência de anticorpos na população adulta, contra

essa bactéria, aproxime-se de 50%, sendo 25% maior nos homens que nas mulheres (KUVIN e KIMMELSTIEL, 1999, p.216). Após a adolescência a soroprevalência continua aumentar atingindo quase a totalidade dos idosos para soropositividade para anticorpos IgG ou IgA (TUUMINEN, 2000, p.734). A infecção é incomum em crianças com menos de cinco anos, mas freqüente em crianças com idade entre oito e quinze anos e adultos jovens. Esse agente é responsável por 10-20% dos casos de pneumonia em crianças e adultos, e por 10-20% dos casos de bronquite em adultos (KLEEMOLA, 1988, 230; GRAYSTON, 1993, p.1231). A transmissão ocorre de pessoa para pessoa através de secreções das vias respiratórias, em comunidades fechadas. As células infectadas apresentam inclusões citoplasmáticas características (CECIL-WYNGAARDEN, SMITH e BENNETT, 1992, p.1783).

Mycoplasma pneumoniae – é uma bactérias que pertence à classe Mollicutes, onde encontram-se as menores formas de vida livre, não necessitando de células hospedeiras para sua replicação. Seu tamanho pode ser comparado ao de um vírus grande, variando de 125 a 150 nm. Os micoplasmas não possuem parede celular, possuem apenas uma membrana limitante de conteúdo lipídico. Essa característica torna-os susceptíveis à lise por soluções hipotônicas, mas resistentes a ação de antibióticos que atuam inibindo a síntese da parede celular (penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, momobactâmicos e carbapenens). *Mycoplasma pneumoniae* tem distribuição mundial, está presente no trato respiratório inferior e superior de humanos, causando infecções assintomáticas, moderadas e raramente severas. Essa bactéria é encontrada em 15-20% dos casos de pneumonia (FOY, 1993, p.37), afetando principalmente crianças, adultos jovens e imunossuprimidos (TAYLOR, 1986, p.671). A transmissão ocorre de pessoa para pessoa através do contato com secreções das vias aéreas.

Em estudo prévio, feito com os mesmos pacientes do presente trabalho, as citocinas (IL-1, L-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α), proteínas de fase aguda (proteína C-reativa e fibrinogênio) e um

marcador de atividade de macrófagos (neopterina) foram dosados no soro dos pacientes e avaliada a relação entre estes marcadores e DAC. Pacientes com DAC apresentaram níveis significativamente mais elevados de IL-6, TNF- α , proteína C-reativa e neopterina (HEINISCH, 2000, p.42).

Embora estudos desta natureza sejam realizados em outros países, a disponibilidade de dados referentes ao nosso país são inexistentes. Pretende-se nessa pesquisa, verificar se o processo da aterosclerose tem correlação com processos infecciosos. Para isso, foram avaliadas as soroprevalências e títulos de anticorpos contra agentes infecciosos, e a possível relação com presença de doença coronariana.

2 - OBJETIVOS

Em uma casuística de pacientes com doença arterial coronária e controles foram efetuadas análises sorológicas (IgM e IgG) para os seguintes agentes infecciosos: Herpes vírus-1, Citomegalovírus, *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* com os seguintes objetivos:

- Observar a existência de associação entre soropositividade (IgM e IgG) contra agentes infecciosos e diferentes síndromes de Doença Arterial Coronariana (AI e AE).
- Avaliar o risco de DAC por infecção com os agentes testados.
- Avaliar se a carga de patógenos pode ser considerada um fator de risco para DAC.

3 - PACIENTES E MÉTODOS

3.1 - Considerações Éticas

O protocolo de pesquisa e o consentimento informado foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSC, sendo aprovado em Março de 2001.

3.2 - Pacientes

No período de março de 1999 a agosto de 2000, foram avaliados consecutivamente 181 pacientes com e sem síndrome clínica de doença arterial coronária. Entre eles, foram selecionados 20 pacientes com Angina Instável, 20 pacientes com Angina Estável e 20 indivíduos sem doença cardiovascular manifesta. As variáveis sexo e idade foram adotadas como critério de pareamento entre os grupos.

Os pacientes incluídos nos grupos de casos, tiveram o diagnóstico de doença coronariana comprovados por cineangiocoronariografia e foram selecionados por um cardiologista do Hospital Universitário (HU/UFSC) durante o período de internação ou consulta ambulatorial neste hospital, quando assinaram o consentimento informado.

3.3 - Critérios de Inclusão dos Pacientes

Foi considerado como critério de inclusão no grupo AI, pacientes com síndrome coronariana aguda (infarto agudo do miocárdio e/ou angina instável) nas primeiras 48hs do episódio e com evidência eletrocardiográfica, enzimática e clínica de isquemia miocárdica ativa.

Foi considerado como critério de inclusão no grupo AE, pacientes com angina estável apresentando dor torácica de características constantes e previsíveis.

Para estar habilitado a ser incluído no grupo C, o indivíduo não poderia ter história clínica ou exames complementares sugestivos de isquemia miocárdica. Os indivíduos desse grupo que realizaram cineangiocoronariografia, não apresentavam obstrução dos vasos coronarianos por aterosclerose.

Em algumas análises, todos os pacientes com doença arterial coronariana (grupos AI e AE) foram incluídos no grupo DAC.

3.4 - Critérios de Exclusão dos Pacientes

Foi considerado como critério de exclusão comum aos grupos mencionados, a presença de qualquer situação patológica que possa elevar os níveis séricos de proteínas inflamatórias. Ex.: traumatismos, hematomas, infecções, pós-operatório, doenças auto-imunes, neoplasias ou diabetes. Além disso, o uso de medicamentos antiinflamatórios ou imunossupressores, a não obtenção do consentimento informado ou qualquer condição clínica que a critério do investigador prejudicasse a análise do estudo, inviabilizava a inclusão do paciente no estudo.

Após obtenção do consentimento informado, realizaram-se coleta de sangue, história clínica, exame físico e registro eletrocardiográfico.

3.5 - Coleta das Amostras

Os pacientes incluídos durante a consulta ambulatorial foram acompanhados até o setor de coletas do laboratório do Hospital Universitário, onde eram obtidas as amostras de sangue venoso, através de *vacutainer*. Após a coleta, esses pacientes eram conduzidos até o setor da Cardiologia, onde eram submetidos à eletrocardiograma, cujo resultado era encaminhado ao cardiologista para avaliação. As coletas nos pacientes incluídos durante o período de internação, foram efetuadas por enfermeiros(as) responsáveis pelo setor. Nesses pacientes foi utilizado

seringas e em seguida transferiu-se o sangue para tubos *vacutainer* iguais aos que foram usados para coletar o sangue dos pacientes do ambulatório.

3.6 - Processamento das Amostras de Soro

A quantidade de sangue coletado de cada paciente foi aproximadamente 8 ml. As amostras eram conduzidas até o laboratório de Imunologia no prédio do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP), onde eram então centrifugadas a 1500 r.p.m., durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação os soros eram separados e aliquotados em microtubos do tipo “eppendorf”, com 300 µl cada, rotulados e congelados a temperatura de -80°C. Todas essas etapas, desde a coleta até o armazenamento no *freezer*, ocorriam em um tempo médio de 25 minutos. O descarte dos tubos com o plasma era feito em hipoclorito 10%, empacotados e descartados como lixo hospitalar.

O procedimento e processamento das amostras para realização dos testes de ELISA, foram realizados no laboratório de Imunologia situado no prédio do MIP-UFSC, 3º andar; seguindo rigorosamente as instruções descritas nos manuais dos fabricantes.

3.7 - Dosagem de Marcadores Infeciosos

As dosagens de anticorpos contra os agentes infecciosos HSV-1, CMV, *H. pylori*, *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae*, no soro dos pacientes foi realizada através do método imunoenzimático ELISA.

Kits comerciais da marca Genzyme Diagnostics foram usados para dosagens de anticorpos IgG e IgM de *Helicobacter pylori* (nº cat: KIF1052 e KIF1053), HSV-1 (nº cat: KIF1093 e KIF1095) e Citomegalovírus (nº cat: 2200 e 2201). Para dosagens de anticorpos IgG e IgM contra

Chlamydia pneumoniae (nº cat: 6111300 e 6111320) e *Mycoplasma pneumoniae* (nº cat:6111400 e 6111420) foram usados *kits* comerciais da marca ThermoLabsystems.

3.7.1 - Dosagem de Anticorpos contra HSV-1, CMV, *H. pylori*, *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae*

Princípio do teste:

O princípio do teste é baseado em um imunoenensaio enzimático indireto de fase sólida, utilizando a peroxidase como marcador enzimático. As placas de ELISA estão previamente sensibilizadas com antígeno dos patógenos estudados, que ficam ligados à superfície de poliestireno no fundo dos poços da placa. Na dosagem de anticorpos IgM contra *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae*, uma solução tampão salina fosfatada com anticorpos anti-IgG humana, é adicionado antes das amostras para evitar possível interferência dos anticorpos IgG nos resultados. Os soros diluídos dos pacientes são adicionados nos poços da placa e a mesma incubadas por uma hora. Anticorpos específicos IgG ou IgM, se presentes na amostra, ligam no antígeno. Os anticorpos que não ligaram são removidos pela solução de lavagem.

O conjugado, um anticorpo contra porção Fc das imunoglobulinas IgG ou IgM humanas, produzido em camundongos, marcado com a enzima peroxidase, é adicionado em cada poço e a placa novamente incubada. Após o tempo de incubação, o excesso de conjugado é removido pelas lavagens. Uma solução contendo o substrato (peróxido de Hidrogênio) e o cromógeno (tetrametilbenzidina-TMB) é adicionada em cada poço e a placa novamente incubada. A enzima peroxidase degrada o peróxido de Hidrogênio, liberando água e oxigênio reativo. O oxigênio reage com TMB e produz cor. A reação é interrompida com uma solução ácida (HCN 1N para HSV-1, CMV e *H. pylori* e H₂SO₄ 0,45M para *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae*) em um tempo

determinado. A intensidade da cor produzida é diretamente proporcional a quantidade de anticorpos IgG ou IgM contra o agente infeccioso que se está pesquisando na amostra.

Os resultados são comparados com os calibradores e controles. A leitura da densidade ótica foi feita por um aparelho leitor de ELISA, no comprimento de onda determinado por cada fabricante.

3.7.2 - Procedimento para Dosagens de Anticorpos IgM e IgG contra HSV-1, CMV e *H.*

***pylori*:**

- As placas de ELISA, com 96 poços, foram previamente sensibilizadas com os antígenos específicos.
- As amostras, os controles e os calibradores foram diluídos 1:40 com o diluente fornecido com cada *kit*, na proporção de 5µl /200µl.
- Após diluição, 100µl das amostras, controles e calibradores foram adicionados em cada poço. O branco foi feito com 100µl de diluente e colocado na posição 1A.
- Em seguida as placas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente para *H. pylori* e a 37° para Citomegalovírus e HSV-1.
- Após incubação o líquido das placas foi desprezado e os poços lavados quatro vezes com solução tampão de lavagem fornecida pelo kit e uma vez com água destilada.
- Foi adicionado 100µl de conjugado enzimático em cada poço.
- As placas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente para *H. pylori* e a 37° para Citomegalovírus e *HSV-1*.
- Após incubação o conjugado enzimático foi desprezado e os poços lavados quatro vezes com solução tampão de lavagem fornecida pelo kit e uma vez com água destilada.

- 100µl do substrato TMB foi adicionado em cada poço.
- As placas foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente para *H. pylori* e 15 minutos a 37° para Citomegalovírus e HSV-1.
- Após o tempo de incubação, 100µl de solução ácida para parar a reação foi adicionado em cada poço e as placas foram agitadas por 30 segundos.
- A leitura da densidade ótica foi feita no comprimento de onda de 450nm, utilizando um aparelho leitor de ELISA, marca Bio-Tek Instruments inc. mod. Elx800 - U.S.A.

3.7.3 - Procedimento para Dosagem de Anticorpos IgM contra *C. pneumoniae* e *M.*

pneumoniae

- Foram usadas placas de ELISA com 96 poços, previamente sensibilizadas com antígenos de *C. pneumoniae* ou *M. pneumoniae*.
- As amostras foram diluídas com diluente da amostra fornecido pelo kit, na proporção 1:101 (500µl de diluente e 5µl de soro).
- Foi adicionado 100µl do reagente removedor IgG para dosagem de IgM contra *C. pneumoniae* e 50µl desse reagente, mais 50 µl de diluente das amostras para dosagem de IgM contra *M. pneumoniae*, nos poços das placas, antes da pipetagem das amostras.
- 10µl das amostras diluídas, dos controles e do calibrador foram pipetados na placa de *C. pneumoniae*. 50µl das amostras diluídas e 100µl dos controles e do calibrador na placa para *M. pneumoniae*.
- As placas foram incubadas por 1h à 37°C e em seguida lavadas cinco vezes com solução de lavagem fornecida pelos kits.
- Foi adicionado 100µl de conjugado e as placas novamente incubadas por 1h à 37°C.

- Após incubação as placas foram lavadas cinco vezes com solução de lavagem.
- Foi adicionado 100µl de substrato (TMB) nos poços e as placas incubadas por 30 min., à temperatura ambiente no escuro.
- 100µl de solução ácida para interromper a reação foi adicionado nos poços.
- A leitura da densidade ótica foi feita no comprimento de onda de 450nm, utilizando um aparelho leitor de ELISA, marca Bio-Tek Instruments inc. mod. Elx800 - U.S.A.

3.7.4 - Procedimento para determinação de títulos de anticorpos IgG contra *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae*:

- Foram usadas placas de ELISA com 96 poços, previamente sensibilizadas com antígenos de *C. pneumoniae* ou *M. pneumoniae*.
- As amostras foram diluídas com diluente da amostra fornecido pelo kit, na proporção 1:101 (500µl de diluente e 5µl de soro) quando testadas para *C. pneumoniae* e 1:201 (1000µl de diluente e 5µl de soro) quando testadas para *M. pneumoniae*.
- Na placa para *C. pneumoniae*, foi adicionado 100µl de diluente da amostra nos poços e em seguida foram pipetados 10µl das amostras diluídas, dos controles e do calibrador.
- Na placa para *M. pneumoniae*, foi pipetado 100µl das amostras diluídas, dos controles e do calibrador.
- As placas foram incubadas por 1h à 37°C e em seguida lavadas cinco vezes com solução de lavagem.
- conjugado foi adicionado na quantidade de 100µl nos poços das placas.

- As placas foram novamente incubadas por 1h à 37°C e em seguida lavadas cinco vezes com solução de lavagem.
- Foi adicionado 100µl de solução de substrato nos poços.
- As placas foram incubadas por 30 min. à temperatura ambiente no escuro.
- 100µl de solução ácida foram adicionados nos poços para interromper a reação.
- A leitura da densidade ótica foi feita no comprimento de onda de 450nm, utilizando um aparelho leitor de ELISA, marca Bio-Tek Instruments inc. mod. Elx800 - U.S.A.

3.8 - Cálculo para determinar soropositividade de IgM contra HSV-1, CMV, *H. pylori*, *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* e IgG contra HSV-1:

Para detectar a presença dos anticorpos acima citados, foram efetuados cálculos matemáticos, onde o valor da densidade ótica da amostra é dividido pelo valor da densidade ótica do calibrador *cut-off* fornecido pelo kit. O valor dessa divisão é chamado de índice. Para HSV-1, CMV e *H. pylori*, o valor do índice estipulado para soropositividade é ≥ 1.00 , indeterminado de 0.91 a 0.99 e negativo se for ≤ 0.90 . Para *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae*, a soropositividade é determinada quando esse valor for maior que 1,1, indeterminada quando for de 0,5 a 1,1 e negativa quando for menor que 0,5.

3.9 - Cálculo para títulos de IgG contra CMV, *H. pylori*, *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae*:

Para dosagem dos anticorpos IgG contra *H. pylori* e *Citomegalovírus*, cada kit fornece padrões em concentrações crescentes para que se construa uma curva de calibração em um gráfico onde o eixo “Y” representa a D.O. e o eixo “X” o título de anticorpos. O valor da D.O. das amostras é colocado nesse gráfico no eixo “Y”, e o ponto onde toca na curva representa

diretamente o valor de títulos de anticorpos no eixo “X”. Um programa de computador utilizando cálculo de regressão linear simples, coloca graficamente no eixo das abscissas os valores de concentração de anticorpos e no eixo das ordenadas os valores da D.O. Para CMV a amostra é considerada negativa quando o valor do título for menor que 1,1 UI/ml, indeterminada quando for entre 1,1 e 1,2 UI/ml e positiva quando for maior que 1,2 UI/ml. Para *H. pylori* a amostra é considerada negativa quando o valor do título for menor que 20,0 UI/ml e positiva quando for maior que 20,0 UI/ml.

Para calcular os valores de títulos de anticorpos IgG contra *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae* nas amostras de soro, foi efetuado um cálculo matemático onde o valor da densidade ótica das amostras é dividido pelo valor da densidade ótica do calibrador *cut-off*. O resultado dessa divisão é multiplicado por 130 (valor em EUI do calibrador) e obtemos então o valor em UI de títulos de anticorpos. Quando o valor do título for menor que 30 UI/ml a amostra é considerada negativa, entre 30 e 45 UI/ml é considerada indeterminada e maior que 45 UI/ml é considerada positiva.

3.10 - Análise Estatística

Trata-se de estudo transversal, controlado e individual. Não houve cálculo prévio quanto o tamanho da casuística. Foi previsto no planejamento inicial do estudo a inclusão de 60 indivíduos, o que foi alcançado. Na estipulação desse número levou-se em consideração viabilidade de inclusão, local de realização e recursos financeiros disponíveis.

As diferenças entre soropositividades, médias de títulos de anticorpos entre grupos, quartis e avaliação do risco de desenvolver doença aterosclerótica foi efetuada através dos testes de proporções entre quartis, teste de Scheffe e *Odds Ratios* através de programas de computador de análise estatística. Os programas utilizados foram o ANOVA, Arcus 2.0. e Epi Info 5.0.

Em situações especiais, quando, por restrições do delineamento do estudo, não é possível obter *a priori* as margens de *status* de exposição (por exemplo. Nos estudos caso-controle), deve-se buscar alternativas à estimação de risco. Nestes estudos os participantes são selecionados com base no status de doença, não sendo usualmente possível calcular a taxa de desenvolvimento de doença, dada a presença ou ausência de exposição. Por consequência, a fórmula apresentada para cálculo de *risco relativo* não pode ser aplicada nestas situações. Busca-se então um estimador do *risco relativo*, através do cálculo de razão de chances (*odds*) de exposição entre os casos em relação à razão de chances de exposição entre os controles. Obtém-se uma razão entre duas razões de chances, conhecida como simplesmente *razão de chances* ou *razão dos produtos cruzados*, sem que estes termos em português consigam dar a ampla conotação do inglês *odds ratio*. Por este motivo manteremos o termo *odds ratio*. Tal razão de chances ou odds ratio é interpretada como um fiel estimador do risco relativo (Drummond e Silva, 1999, p.47).

Financiamento

Este projeto foi parcialmente financiado pela FUNCITEC (277-02), pela CAPES (bolsa emergencial) e pelo CNPq (bolsa de produtividade em pesquisa).

3.11 - Lista de Reagentes

Reagentes usados para dosagem de anticorpos IgG e IgM contra *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae*:

- Solução para diluir a amostra – tampão salino de fosfato, um reagente de cor azul e 0,05% de Bronidox[®] como conservante.
- Reagente removedor de IgG – anticorpos contra IgG de humanos em tampão salino de fosfato e 0,05% de Bronidox[®] como conservante.

- Controle negativo – soro humano diluído, negativo para anticorpos contra *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae*, um reagente de cor vermelha e 0,05% de Bronidox[®] como conservante.
- Controle positivo - soro humano diluído, positivo para anticorpos contra *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae*, um reagente de cor vermelha e 0,05% de Bronidox[®] como conservante.
- Controle *cut-off* – soro humano diluído contendo quantidade conhecida de anticorpos contra *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae*, um reagente de cor vermelha e 0,05% de Bronidox[®] como conservante.
- Conjugado – tampão salino, reagente de cor vermelha, anticorpos contra IgM ou IgG humanos marcados com a enzima peroxidase e 0,1% de N-metilisotiazolone como conservante.
- Solução de substrato – tampão citrato de 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine e peróxido de Hidrogênio e 0,01% de *Kathon CG* como conservante.
- Solução para interromper a reação – H₂SO₄ 0,45M.
- Solução de lavagem – tampão salino de citrato concentrado e 0,05% de Bronidox[®] como conservante.

Reagentes usados para dosagem de anticorpos IgG e IgM contra HSV-1, CMV e *H. pylori*:

- Solução para diluir a amostra, controles negativo, positivo e *cut-off*, calibradores, e solução de lavagem não tiveram sua composição descrita no manual do fabricante.
- Conjugado – anticorpos contra IgG e IgM humanas marcados com uma enzima, composição não descrita no manual do fabricante.
- Solução de substrato – 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine e peróxido de Hidrogênio.
- Solução para interromper a reação – HCL 1N.

4 - RESULTADOS

4.1 - Características Basais dos Grupos Estudados

Os grupos foram pareados por sexo e idade. De modo geral, não houve diferenças entre os grupos em relação as variáveis socioeconômicas e demográficas, aos fatores de risco tradicionais para DAC e aos exames laboratoriais (Tabelas 1, 2 e 3 do Anexo, *apud* HEINISCH, 2000).

No período de março de 1999 a agosto de 2000, foram avaliados consecutivamente 181 pacientes com e sem síndrome clínica de doença arterial coronária. Entre eles, foram selecionados 20 pacientes com Angina Instável, 20 pacientes com Angina Estável e 20 indivíduos sem doença cardiovascular manifesta.

4.2 - Vírus Herpes-1

Anticorpos IgM

Dos 60 pacientes estudados, 5% (n=3) foram positivos para anticorpos IgM. No grupo de DAC, a soropositividade foi de 7,5% (n=3) e no grupo C não houve soropositivos. Quando comparados, esses dois grupos não apresentaram diferença estatística ($P>0,05$). Em relação às formas clínicas de DAC, no grupo AI houve 5% (n=1) de soropositivos e no grupo AE 10% (n=2). Também não houve diferença estatística para porcentagem de soropositividade entre os grupos (AI X AE $P=0,54$; AI X C $P=0,31$ e AE X C $P=0,14$) (Tabela 2). A porcentagem de pacientes soronegativos e indeterminados para IgG está ilustrada na figura 1 do apêndice.

Anticorpos IgG

Nos três grupos estudados, todos os pacientes foram soropositivos para IgG contra Herpes-1 (figura 2 do apêndice), não existindo diferença estatística entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2: Porcentagem de soropositividade contra cada patógeno nos diferentes grupos. O valor de P representa comparação entre os grupos.

Patógenos	IgM				IgG			
	AI	AE	C	P	AI	AE	C	P
HSV-1	5	10	0	N.S.	100	100	100	N.S.
CMV	0	15	0	N.S.	90	95	90	N.S.
<i>H.pylori</i> ^a	45	15	25	0,03	70	85	85	N.S.
<i>C. pneumoniae</i>	5	0	0	N.S.	70	55	40	N.S.
<i>M. pneumoniae</i> ^b	5	0	0	N.S.	75	95	50	0,001

a = significância estatística entre os grupos AI e AE

b = significância estatística entre os grupos AE e C

AI = angina instável; AE = angina estável; C = controles

IgM = imunoglobulina M

IgG = imunoglobulina G

N.S. = não significativo

HSV-1 = Herpes vírus- 1

CMV = Citomegalovírus

H. pylori = *Helicobacter pylori*

C. pneumoniae = *Chlamydia pneumoniae*

M. pneumoniae = *Mycoplasma pneumoniae*

4.3 - Citomegalovírus

Anticorpos IgM

Nos 60 pacientes estudados, 5% (n=3) foram positivos para anticorpos IgM contra CMV. Estes pacientes pertenceram ao grupo de doença coronariana (AE). Não houve diferença estatística em relação ao grupo C e nem ao grupo AI ($P>0,05$) (Tabela 2). A porcentagem de pacientes soronegativos e indeterminados para IgM está ilustrada na figura 3 do apêndice.

Anticorpos IgG

Dos 60 pacientes estudados, 91,6% (n=54) foram positivos para anticorpos IgG contra CMV. No grupo DAC houve 92,5% (n=37) de soropositivos e no grupo C 90% (n=18). Quando a soropositividade desses grupos foi comparada, não observamos diferença estatística (Tabela 3). O

valor de *odds ratio* para soropositividade no grupo DAC também não foi significativo (1,37 - IC 95% 0,14-11,51) (Figura 2).

Quando analisados individualmente, o grupo AI apresentou 90% de soropositivos, enquanto que o grupo AE 95%. Incluindo o grupo C, não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($P=0,8$), nem quando foram analisados entre si AI x AE, AI x C e AI x AE (Tabela 2). A porcentagem de pacientes soronegativos e indeterminados para IgG está ilustrada na figura 4 do apêndice.

Títulos

Os resultados dos títulos de anticorpos IgG contra CMV, nos grupos estudados, estão expressos na figura 3. O valor mínimo encontrado foi de 0,00 UI/ml e o máximo de 17,26 UI/ml. A média e o desvio padrão dos valores totais foi $12,23 \pm 4,47$ UI/ml.

O valor da média e desvio padrão de títulos de anticorpos IgG contra CMV nos pacientes com doença coronariana foi $12,7 \pm 4,3$ UI/ml e no grupo C $11,2 \pm 4,7$ UI/ml. Não houve diferença estatística entre as médias dos grupos DAC versus C ($P>0,05$) (Tabela 4).

Os títulos de anticorpos IgG contra CMV no grupo AI foi $12,9 \pm 4,9$ UI/ml e no grupo AE $13,43 \pm 3,6$ UI/ml. Não houve diferença estatística significativa para os valores das médias entre os grupos em geral ($P=0,28$) e nem quando os grupos foram comparados entre si, AI versus AE, AE versus C e AI versus C ($P>0,05$).

Em análise posterior, os valores de títulos IgG para CMV foram divididos em quartis. O primeiro quartil abrange valores até 11,36 UI/ml e o quartil superior inclui os valores a partir de 14,84 UI/ml. Efetuada a distribuição dos valores de IgG para CMV dos diferentes grupos de pacientes nos quartis superior e inferior, observou-se frequência de 14 pacientes no quartil superior) e de 15 pacientes no quartil inferior. Comparando as distribuições dos pacientes com

Tabela 3: Associação entre soropositividade (IgG) para cada patógeno e DAC

Patógenos	Frequência de anticorpos (%)		Valor de P
	Pacientes com DAC	Pacientes sem DAC	
HSV-1	100	100	N.S.
CMV	92,5	90	N.S.
<i>H. pylori</i>	77,5	85	N.S.
<i>C. pneumoniae</i>	62,5	40	N.S.
<i>M. pneumoniae</i>	85	50	0,002

DAC = doença arterial coronariana
 IgG = imunoglobulina G
 N.S. = não significativo

HSV-1 = Herpes vírus- 1
 CMV = Citomegalovirus
H. pylori = *Helicobacter pylori*
C. pneumoniae = *Chlamydia pneumoniae*
M. pneumoniae = *Mycoplasma pneumoniae*

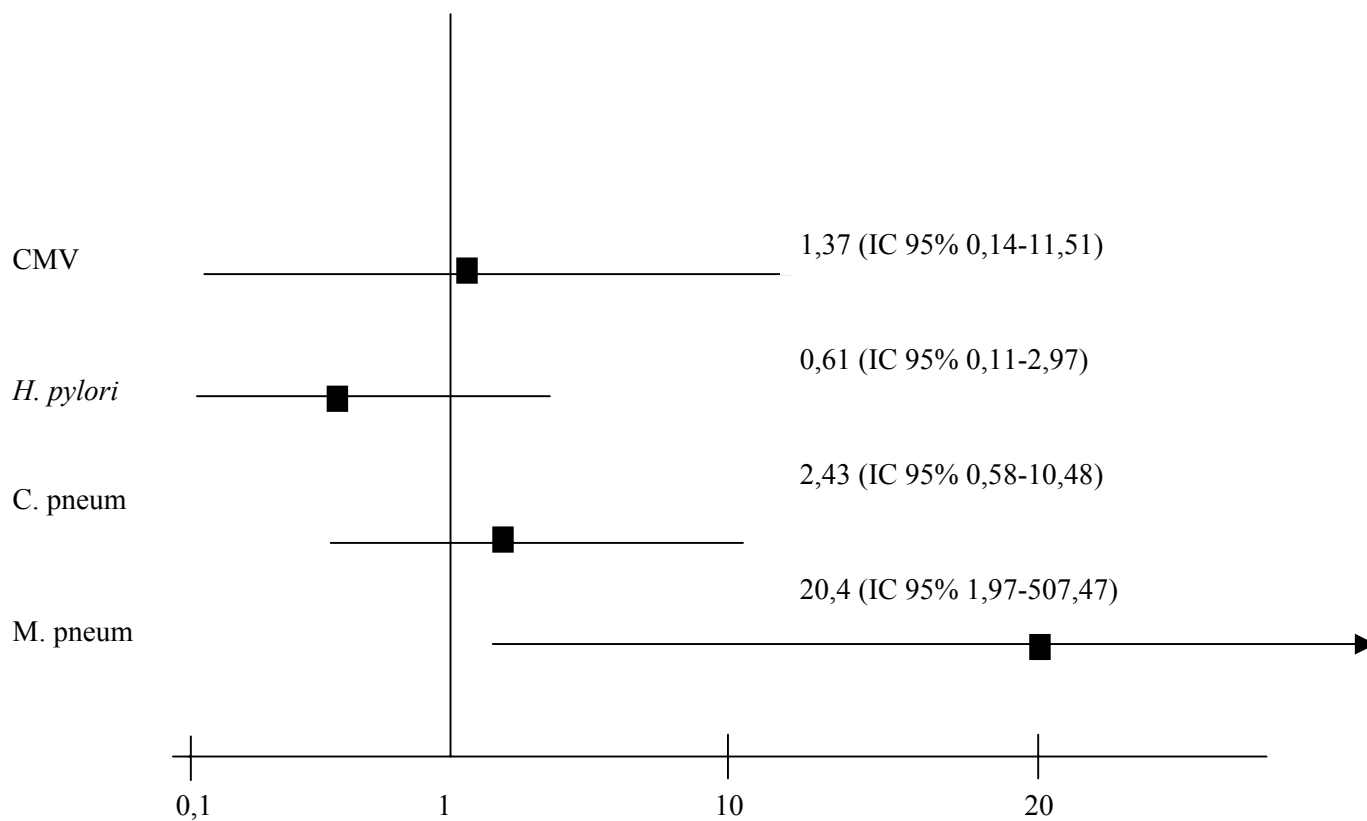


Figura 2: *Odds ratio* para DAC em pacientes soropositivos (IgG) para cada patógeno. As razões de risco, interpretadas como valor de *odds ratio* (IC 95%), comparam pacientes positividade de anticorpos e presença da doença. Os quadrados escuros indicam o valor de *odds ratio* e as linhas o intervalo de confiança (IC) 95%. Quando o IC for maior que 1, o valor de *odds ratio* é significativo.

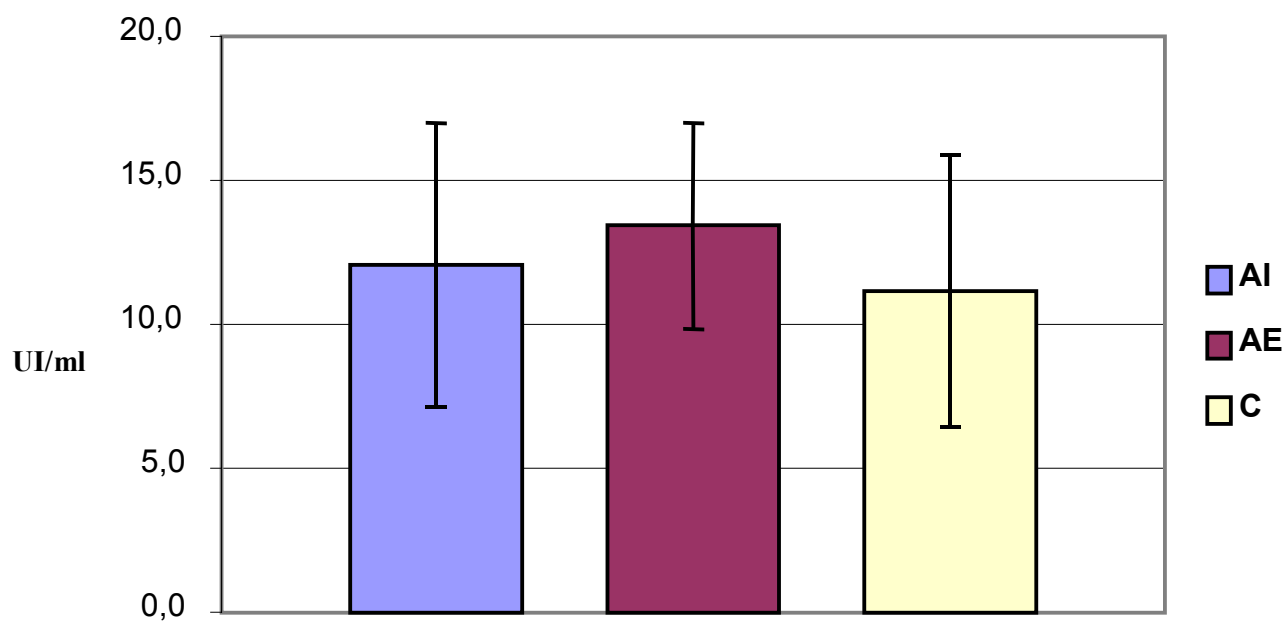


Figura 3: Títulos de anticorpos contra CMV nos diferentes grupos.

AI = angina instável (n=20); AE = angina estável (n=20); C = controles (n=20).

As colunas representam as médias e as barras o desvio padrão.

Patógenos	Títulos de anticorpos (UI/ml)		Valor de P
	Pacientes com DAC	Pacientes sem DAC	
CMV	12,7±4,3	11,2±4,7	N.S.
<i>H. pylori</i>	62,6±38,5	64,4±30,5	N.S.
<i>C. pneumoniae</i>	89,5±67,8	60,5±55,4	N.S.
<i>M. pneumoniae</i>	159,2±97,8	66,7±56,8	0,003

DAC = doença arterial coronariana
 IgG = imunoglobulina G
 N.S. = não significativo

HSV-1 = Herpes vírus- 1
 CMV = Citomegalovirus
H. pylori = *Helicobacter pylori*
C. pneumoniae = *Chlamydia pneumoniae*
M. pneumoniae = *Mycoplasma pneumoniae*

DAC (AE + AI) versus controles, não detectamos diferenças estatisticamente significativas ($P=0,42$). Analisando por grupos, no quartil superior 7 pacientes eram do grupo AI, 5 do grupo AE e 2 do grupo C. No quartil inferior 7 eram do grupo AI, 2 do grupo AE e 6 do grupo C. Não foi possível demonstrar diferença estatisticamente significativa entre os grupos, em relação à locação dos pacientes nos quartis inferior e superior ($P=0,31$). Da mesma forma, a distribuição dos pacientes nos quartis superior e inferior, entre os grupos AE versus AI ($P=0,64$), AI versus C ($P=0,67$) e AE versus C ($P=0,31$), não apresentou diferença estatística significativa.

Para avaliar o risco de ocorrer doença coronariana, foi realizada a análise de *odds ratio* sobre a distribuição de pacientes com DAC (AE e AI) e sem doença (C), nos quartis superior e inferior. Não houve diferença na frequência de pacientes com e sem doença, nos quartis superior e inferior ($P>0,05$). Desta forma, não foi possível demonstrar risco maior para a doença nos pacientes que se encontram no quartil superior, ou seja, aqueles com os maiores títulos de IgG contra CMV, quando comparados com pacientes no quartil inferior (O.R. 4,0 IC 95% 0,51–37,8). (figura 4)

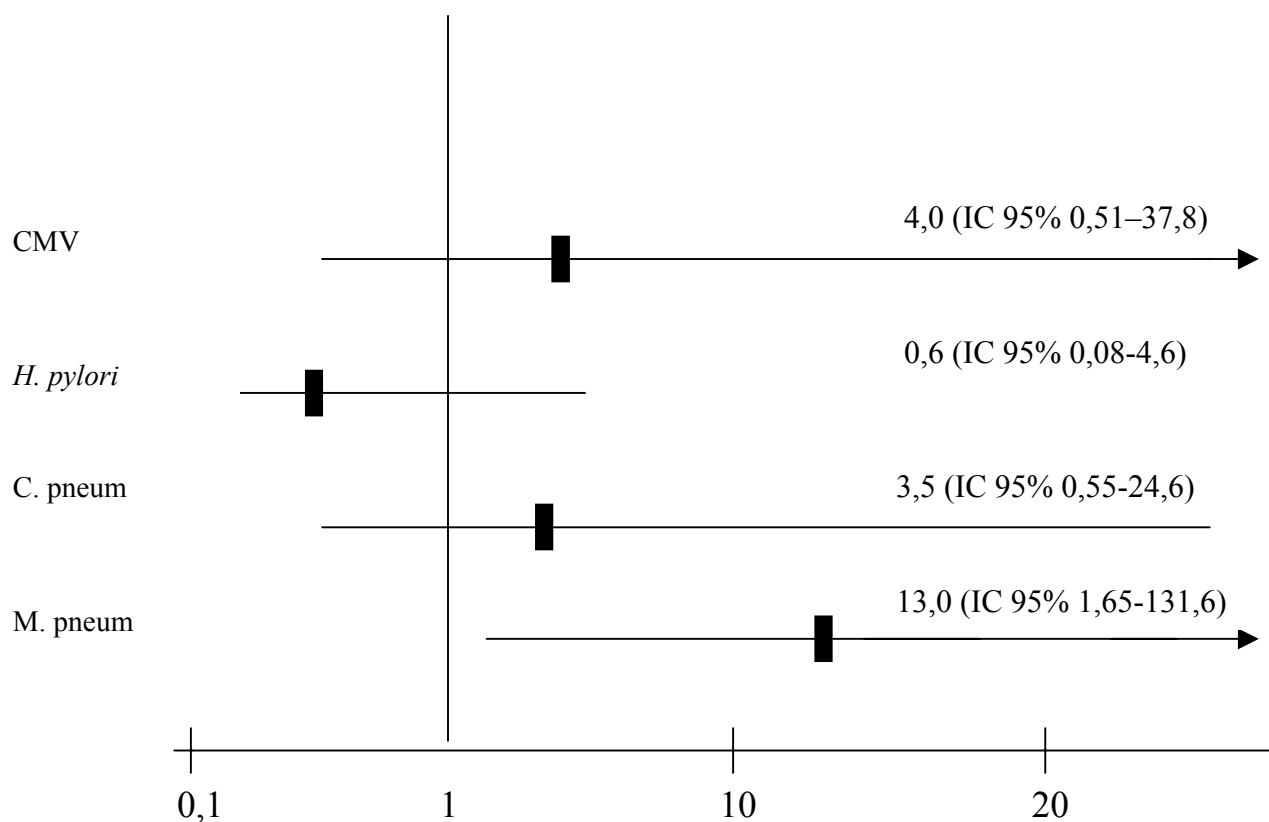


Figura 4: *Odds ratio* para DAC em pacientes com altos títulos de anticorpos (IgG) para cada patógeno. As razões de risco, interpretadas pelo valor de *odds ratio* (IC 95%), comparam a distribuição dos pacientes nos quartis superior e inferior das medidas basais. Os quadrados escuros representam o valor de *odds ratio* e as linhas o intervalo de confiança (IC) 95%. Quando o IC for maior que 1, o valor de *odds ratio* é significativo.

HSV-1 = Herpes vírus- 1
 CMV = Citomegalovírus
H. pylori = *Helicobacter pylori*
C. pneumoniae = *Chlamydia pneumoniae*
M. pneumoniae = *Mycoplasma pneumoniae*

4.4 - *Helicobacter pylori*

Anticorpos IgM

Dos 60 pacientes estudados, 28,3% foram soropositivos para anticorpos IgM contra *H. pylori*. No grupo de pacientes com doença coronariana, a soropositividade foi de 30% (n=12) e no grupo C foi 25% (n=5). Quando comparados esses dois grupos não apresentaram diferença estatística ($P>0,05$).

No grupo AI a soropositividade foi de 45% (n=9) e no grupo AE foi 15% (n=3). Quando as porcentagens de soropositividade entre estes dois grupos (AI *versus* AE) foram comparadas, houve diferença estatisticamente significativa ($P = 0,038$) (Tabela 2). Não houve no entanto, diferença estatística entre as soropositividades dos grupos AE ($P=0,18$) e AI ($P=0,43$), quando comparados com o grupo C. A porcentagem de pacientes soronegativos e indeterminados para IgM está ilustrada na figura 5 do apêndice.

Anticorpos IgG

Dos 60 pacientes estudados, 80% (n=48) foram positivos para anticorpos IgG contra *H. pylori*. A soropositividade no grupo DAC foi de 77,5% (n=31) e no grupo C 85% (n=17), não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P=0,3$) (Tabela 3). Também o valor de *odds ratio* para soropositividade no grupo DAC (0,61 - IC 95% 0,11-2,97) não foi significativo (Figura 2).

A positividade de anticorpos IgG contra *H. pylori*, no grupo AI foi de 70% (n=14) e nos grupos AE 85% (n=17), não sendo diferente estatisticamente, incluindo o grupo C ($P>0,05$) (Tabela 2). A porcentagem de pacientes soronegativos e indeterminados para IgG está ilustrada na figura 6 do apêndice.

Títulos

Os resultados dos títulos de anticorpos IgG contra *H. pylori*, nos grupos estudados estão expressos na Figura 5. O valor mínimo encontrado foi de 0,00 UI/ml e o máximo de 97,0 UI/ml. A média e o desvio padrão dos valores totais foram $63,23 \pm 35,80$ UI/ml.

A média e o desvio padrão dos pacientes com DAC foi $62,65 \pm 38,54$ UI/ml e para o grupo C, $64,4 \pm 30,5$ UI/ml, não havendo diferença estatística ($P > 0,05$) (Tabela 4).

A média e o desvio padrão para o grupo AI foi $54,4 \pm 41,9$ UI/ml e para o grupo AE $70,9 \pm 34,0$ UI/ml. Neste caso, a média do grupo AE foi estatisticamente maior que a média do grupo AI ($P = 0,037$). Os grupos AI e AE quando comparados com grupo controle não foram diferentes estatisticamente ($P > 0,05$).

Em análise posterior, os valores de IgG para *H. pylori* foram divididos em quartis. O primeiro quartil abrange valores até 35 UI/ml e o quartil superior se inclui valores a partir de 94 UI/ml. Efetuada a distribuição dos valores de IgG para *H. pylori* dos diferentes grupos de pacientes nos quartis superior e inferior, observou-se frequência de 14 pacientes no quartil superior e de 15 pacientes no quartil inferior. Comparando as distribuições dos pacientes com DAC (AE + AI) versus controles, não detectamos diferenças estatisticamente significativas ($P = 0,68$). Analisando por grupos, no quartil superior 4 pacientes eram do grupo AI, 6 do grupo AE e 4 do grupo C. No quartil inferior 8 eram do grupo AI, 4 do grupo AE e 3 do grupo C. Não foi possível demonstrar diferença estatisticamente significativa entre os grupos, em relação à locação dos pacientes nos quartis inferior e superior ($P = 0,27$). Da mesma forma, a distribuição dos pacientes nos quartis superior e inferior, entre os grupos AE versus AI ($P = 0,14$), AI versus C ($P = 0,36$) e AE versus C ($P = 1,00$), não apresentou diferença estatística significativa.

Para avaliar o risco de ocorrer doença coronariana, foi realizada a análise de *odds ratio* sobre a distribuição de pacientes com DAC (AE e AI) e sem doença (C), nos quartis

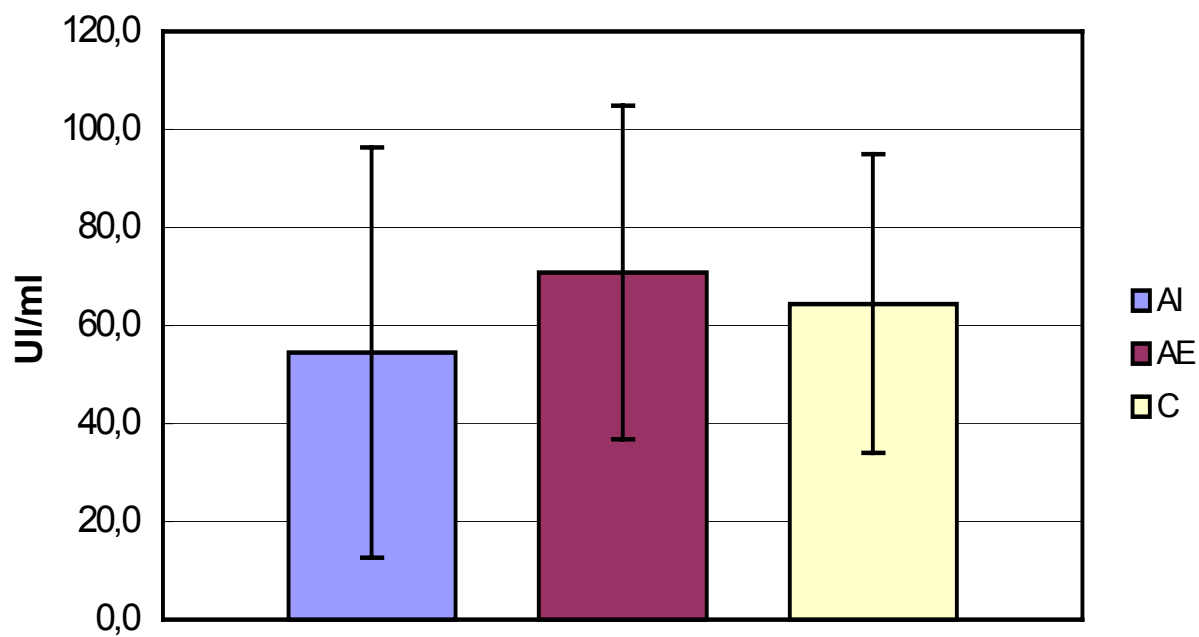


Figura 5: Títulos de anticorpos contra *H. pylori* nos diferentes grupos.

AI = angina instável (n=20); AE = angina estável (n=20); C = controles (n=20).

As colunas representam os valores das médias e as barras o desvio padrão.

superior e inferior. Não houve diferença na frequência de pacientes com e sem doença, nos quartis superior e inferior ($P>0,05$). Desta forma, não foi possível demonstrar risco maior para a doença nos pacientes que se encontram no quartil superior, ou seja, aqueles com os maiores títulos de IgG contra *H. pylori*, quando comparados com pacientes no quartil inferior (O.R. 0,63 IC 95% 0,08-4,6) (Figura 4).

4.5 - *Chlamydia pneumoniae*

Anticorpos IgM

Dos 60 pacientes estudados, houve apenas um paciente, do grupo AI, soropositivo para IgM contra *C. pneumoniae*. Não existindo diferença estatística entre os grupos em relação à soropositividade para IgM contra *C. pneumoniae* (Tabela 2).

Anticorpos IgG

Dos 60 pacientes estudados, 55% (n=33) foram positivos para anticorpos IgG contra *C. pneumoniae*. Quando a soropositividade dos grupos com DAC (AE + AI) foi comparada à do grupo C, não houve diferença estatística [62,5% (n=25) e 40% (n=8), respectivamente - $P=0,16$] (Tabela 3). O valor de *odds ratio* para soropositividade no grupo DAC também não foi significativo (2,43-IC 95% 0,58-10,48) (Fig. 2).

A positividade de anticorpos IgG contra *C. pneumoniae* no grupo AI foi de 70% (n=14), no grupo AE 55% (n=11). Incluindo o grupo C, também não observamos diferença estatística significativa entre esses grupos ($P=0,20$) (Tabela 2). A porcentagem de pacientes soronegativos e indeterminados para IgG está ilustrada na figura 7 do apêndice.

Títulos

Os resultados dos títulos de anticorpos IgG contra *C. pneumoniae* nos grupos estudados, estão expressos na figura 6. O valor mínimo encontrado foi de 9,8 UI/ml e o máximo de 218,2 UI/ml. A média dos valores totais foi 79,85 UI/ml.

Os valores da média e desvio padrão de títulos de anticorpos IgG contra *C. pneumoniae* nos pacientes com DAC (AE + AI), foram $89,5 \pm 67,8$ UI/ml e no grupo C foi $60,52 \pm 55,42$ UI/ml. Não houve diferença estatística entre as médias dos grupos DAC versus C ($P=0,10$) (Tabela 4).

Os títulos de anticorpos IgG contra *C. pneumoniae* no grupo AI foram $100,03 \pm 72,55$ UI/ml e no grupo AE $79,00 \pm 62,88$ UI/ml. Incluindo o grupo C, não houve diferença estatística significativa para os valores das médias entre os grupos em geral ($P>0,05$) e nem quando os grupos foram comparados entre si, AI versus AE ($P=0,58$), AE versus C ($P=0,66$) e AI versus C ($P=0,15$).

Em análise posterior, os valores de títulos IgG para *C. pneumoniae* foram divididos em quartis. O primeiro quartil inferior abrange valores até 28,67 UI/ml e o quartil superior engloba valores a partir de 119,02 UI/ml. Efetuada a distribuição dos valores de IgG para *C. pneumoniae* dos diferentes grupos de pacientes nos quartis superior e inferior, observou-se frequência de 15 pacientes no quartil superior e 15 pacientes no quartil inferior. Comparando as distribuições dos pacientes com DAC (AE + AI) versus controles, não detectamos diferenças estatisticamente significativas ($P=0,25$). Analisando por grupos, no quartil superior 7 pacientes eram do grupo AI, 5 do grupo AE e 3 do grupo C. No quartil inferior 3 pacientes eram do grupo AI, 6 do grupo AE e 7 do grupo C. Não foi possível demonstrar diferença estatisticamente significativa entre os grupos, em relação à locação dos pacientes nos quartis inferior e superior ($P=0,20$). Da mesma forma, a distribuição dos pacientes nos quartis superior e inferior, entre os grupos AE versus AI, AI versus C e AE versus C, não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($P>0,05$).

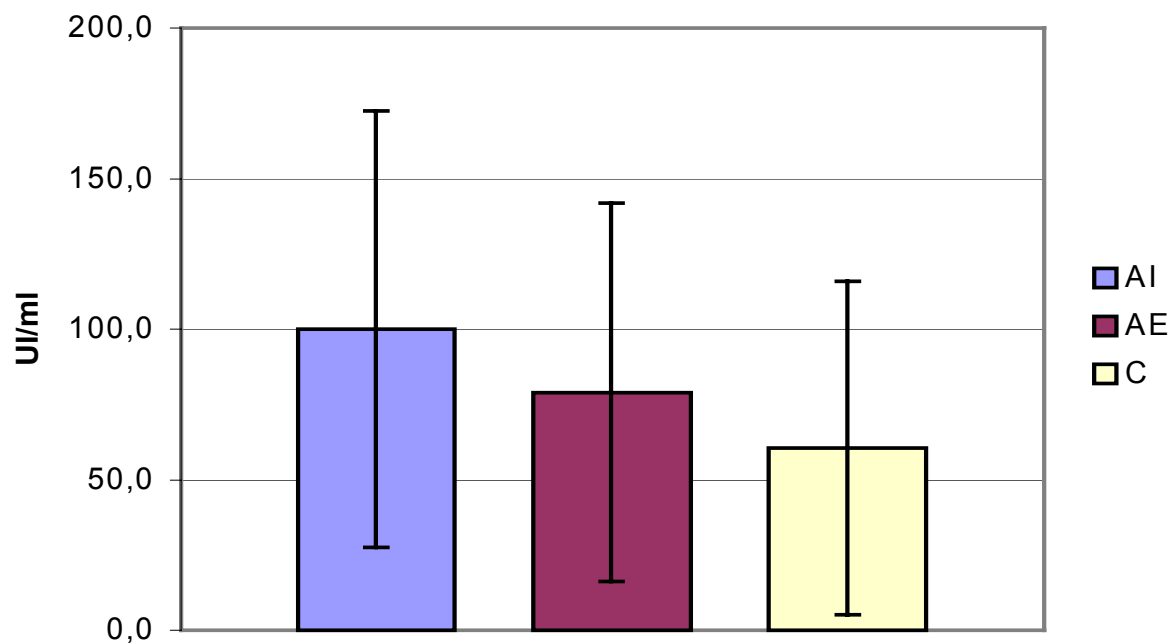


Figura 6: Títulos de anticorpos contra *C. pneumoniae* nos diferentes grupos.

AI = angina instável (n=20); AE = angina estável (n=20); C = controles (n=20).

As colunas representam os valores das médias e as barras o desvio padrão.

Para avaliar o risco de ocorrer doença coronariana, foi realizada a análise de *odds ratio* sobre a distribuição de pacientes com DAC (AE e AI) e sem doença (C), nos quartis superior e inferior. Não houve diferença na frequência de pacientes com e sem doença, nos quartis superior e inferior ($P>0,05$). Desta forma, não foi possível demonstrar risco maior para DAC nos pacientes que se encontram no quartil superior, ou seja, aqueles com os maiores títulos de IgG contra *C. pneumoniae* quando comparados com pacientes no quartil inferior (*odds ratio* 3,50 IC 95% 0,55-24,6) (Figura 4).

4.6 - *Mycoplasma pneumoniae*

Anticorpos IgM

Dos 60 pacientes estudados, houve apenas um paciente, do grupo AI, soropositivo para IgM contra *M. pneumoniae*. Não existindo diferença estatística entre os grupos em relação à soropositividade para IgM contra *M. pneumoniae* (Tabela 2).

Anticorpos IgG

Dos 60 pacientes estudados, 73,3% (n=44) foram positivos para anticorpos IgG contra *M. pneumoniae*. A soropositividade no grupo DAC foi 85% (n=34) e no grupo C de 50% (n=10). Comparando a soropositividade nestes dois grupos encontramos uma diferença significativa ($P=0,002$) (Tabela 3), e o valor de *odds ratio* para DAC, em pacientes soropositivos mostrou um risco de 20,4 (IC 95% 1,97-507,47) vezes maior de ocorrer a doença (Figura 2).

A positividade para anticorpos IgG contra *M. pneumoniae* no grupo AI foi de 75% (n=15), no grupo AE foi 95% (n=19). Incluindo o grupo C, houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P=0,005$). Comparando a soropositividade dos grupos entre si, encontramos diferença estatística significativa entre os grupos AE versus C ($P=0,001$), mas não

entre os grupos AE versus AI ($P=0,18$) e AI versus C ($P= 0,10$) (Tabela 2). A porcentagem de pacientes soronegativos e indeterminados para IgG está ilustrada na figura 8 do apêndice.

Títulos

Os resultados dos títulos de anticorpos IgG contra *M. pneumoniae*, nos grupos estudados, estão expressos na figura 7. O valor mínimo encontrado foi de 0,00 UI/ml e o máximo de 97,0 UI/ml. A média e o desvio padrão dos valores totais foi $115,00 \pm 92,5$ UI/ml.

Os valores da média e desvio padrão de títulos de anticorpos IgG contra *M. pneumoniae* nos pacientes com doença coronariana (AE + AI), foram $159,2 \pm 97,8$ UI/ml e no grupo C $66,70 \pm 56,80$ UI/ml. Houve diferença estatística entre os valores das médias desses grupos ($P=0,003$) (Tabela 4).

O valor da média e desvio padrão de títulos de anticorpos IgG contra *M. pneumoniae* no grupo AI foram de $111,43 \pm 88,95$ UI/ml e no grupo AE $166,83 \pm 100,69$ UI/ml. Incluindo o grupo C, houve diferença estatisticamente significativa entre os valores das médias entre os grupos ($P=0,0017$). Quando comparados entre si, encontramos diferença estatística entre os grupos AE versus C ($P=0,0018$), mas não entre os grupos AI versus C e AI versus AE ($P>0,05$).

Em análise posterior, os valores de IgG para *M. pneumoniae* foram divididos em quartis. O primeiro quartil abrange valores até 44,65 UI/ml e o quartil superior inclui valores a partir de 170,97 UI/ml. Efetuada a distribuição dos valores de IgG para *M. pneumoniae* dos diferentes grupos de pacientes nos quartis superior e inferior, observou-se frequência de 15 pacientes no quartil superior e de 15 pacientes no quartil inferior. A distribuição dos pacientes com DAC (AE + AI) foi diferente estatisticamente quando comparados com a distribuição dos pacientes do grupo C ($P=0,01$). Analisando por grupos, no quartil superior, observamos a frequência de 3 pacientes com AI, 10 com AE e 2 do grupo C. No quartil inferior encontramos 4 pacientes com

AI, 1 com AE e 10 do grupo C. Em relação à locação dos pacientes nos quartis superior e inferior, houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P=0,001$). Comparando a distribuição dos pacientes nos quartis superior e inferior, entre os grupos AI versus AE e AE versus C, encontramos diferença significativa ($P=0,04$). O mesmo não ocorreu entre os grupos AI versus C ($P>0,05$).

Para avaliar o risco de desenvolver doença coronariana, foi realizada a análise de *odds ratio* sobre a distribuição de pacientes com DAC (AE e AI) e sem doença (C), nos quartis superior e inferior. Houve diferença estatística na distribuição dos pacientes ($P=0,003$) e o valor de *odds ratio* demonstrou um aumento de 13,0 vezes (IC 95% 1,65-131,6) no risco para ocorrer DAC nos pacientes que se encontram no quartil superior, sendo também significativo (Figura 4).

4.7 - Carga de Patógenos

Para avaliar a relação entre infecções concomitantes e aterosclerose, observamos se existe associação entre número de patógenos que o paciente tenha sido exposto (carga de patógenos) e o risco para ocorrer DAC.

Para realizar essa análise, os pacientes foram categorizados como soropositivos para três, quatro e cinco patógenos. A soropositividade para três patógenos nos 60 pacientes foi de 18,3% ($n=11$), para quatro patógenos foi 48,3% ($n=29$) e para cinco foi 28,3% ($n=17$). A distribuição de pacientes soropositivos para três, quatro e cinco patógenos não foi diferente entre os grupos AI, AE e C ($P=0,81$, $P=0,71$ e $P=0,10$ respectivamente).

Quanto ao risco de desenvolver DAC, os pacientes soropositivos para três, quatro e cinco patógenos apresentaram valor de *odds ratio* igual a 0,85 (CI 95% 0,18-4,10), e 3,05 (CI 95% 0,67-15,78) respectivamente, não sendo significativos (fig. 8). Dessa forma não foi possível demonstrar associação entre carga de patógenos e risco de ocorrer DAC.

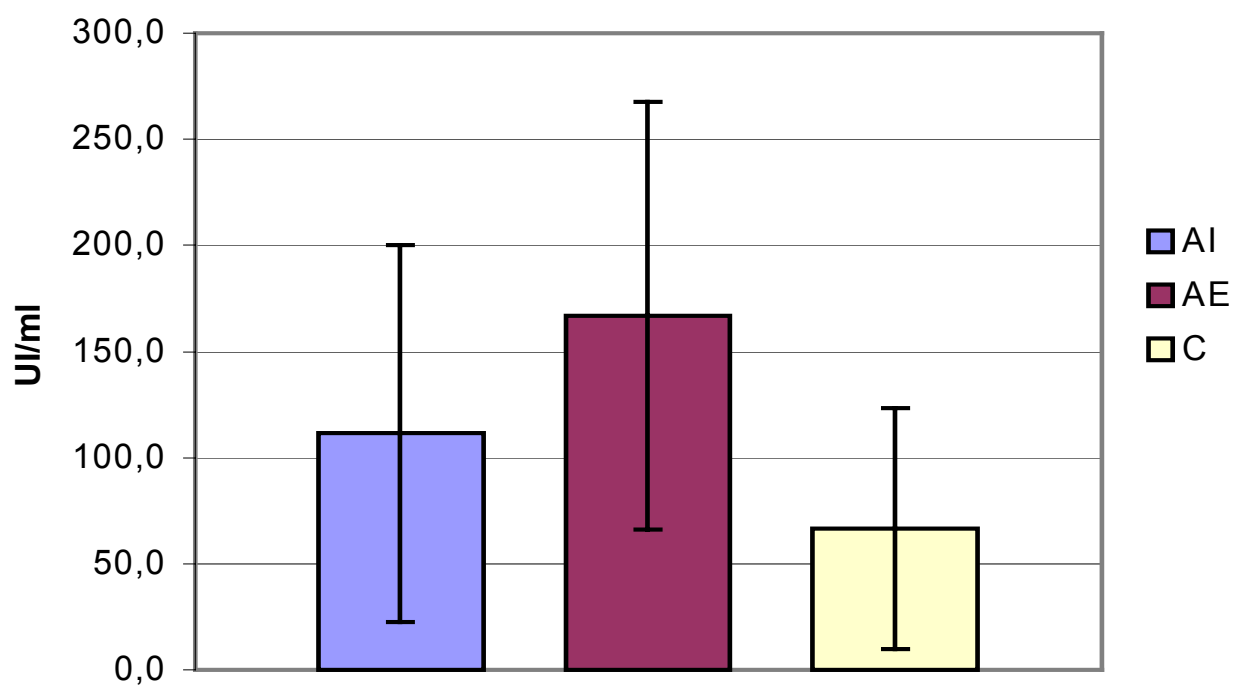


Figura 7: Títulos de anticorpos contra *M. pneumoniae* nos diferentes grupos.

AI = angina instável (n=20); AE = angina estável (n=20); C = controles (n=20).

As colunas representam os valores das médias e as barras o desvio padrão.

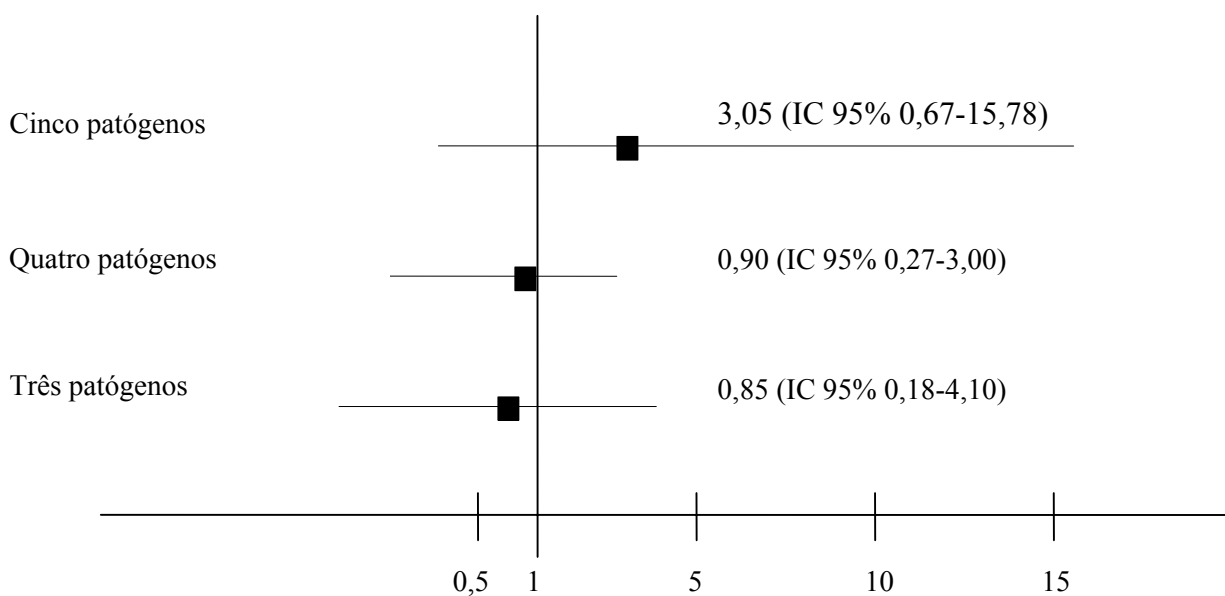


Figura 8: *Odds ratio* para DAC em pacientes soropositivos (IgG) para vários patógenos (carga de patógenos). As razões de risco, interpretadas pelo valor de *odds ratio* (IC 95%), comparam cada grupo de pacientes soropositivos para 3, 4 e 5 patógenos com os demais pacientes. Os quadrados representam o valor de *odds ratio* e as linhas o intervalo de confiança (IC) 95%. Quando o IC for maior que 1, o valor de *odds ratio* é significativo.

HSV-1 = Herpes vírus- 1
 CMV = Citomegalovirus
H. pylori = *Helicobacter pylori*
C. pneumoniae = *Chlamydia pneumoniae*
M. pneumoniae = *Mycoplasma pneumoniae*

5 - DISCUSSÃO

A maior contribuição do presente estudo foi a demonstração, através de exames sorológicos, da associação entre dois agentes infecciosos, *H. pylori* e *M. pneumoniae* e DAC. Embora outros autores também tenham revelado tal associação, é a primeira vez que se realiza um estudo sorológico amplo com tal finalidade em nosso país.

Outro ponto importante a ser destacado sobre este estudo foi a seleção dos pacientes, dentro dos critérios estabelecidos. Sendo idosos a maioria dos pacientes que apresentam doença coronariana, encontrar aqueles que fossem portadores apenas dessa doença foi uma tarefa de paciência e extrema importância para garantir a credibilidade do estudo.

Mecanismos inflamatórios estão envolvidos na patogênese da aterosclerose (Ross, 1999) e estudos prévios mostram valor prognóstico de marcadores inflamatórios como as citocinas IL-6 (BIASUCCI *et al.*, 1996, p.874) e TNF- α (RIDKER *et al.*, 2000, p.1767), e a proteína de fase aguda, proteína C-reativa (LIUZZO, 1994, p.417), para o desenvolvimento da aterosclerose.

Embora muitos estudos tenham mostrado associação sorológica entre infecção e aterosclerose para vários patógenos (ESPINOLA *et al.*, 2002, p.2581; RUPPRECHT *et al.*, 2001, p.25), e alguns autores tenham detectado a presença de microrganismos na placa aterosclerótica (CHIU *et al.*, 1997, p.2144; HIGUCHI, 2000, p.1023), um consenso sobre o papel da infecção na aterosclerose não foi alcançado. Esse fato poderia ser explicado pelas limitações e contradições de estudos soroepidemiológicos. Contradições porque enquanto alguns estudos demonstram associação sorológica entre soropositividade e/ou altos títulos de anticorpos contra certos agentes infecciosos, com doença coronariana, outros estudos de mesma natureza não o fazem (STOLLBERGER *et al.*, 2001, p.997; GARCIA *et al.*, 2001, p.435). Limitações porque avalia-se a presença de infecção ou contato com o microrganismo pela produção de anticorpos, que é um

processo complexo envolvendo muitas variáveis. Desta forma, a não detecção destes anticorpos não garante que o indivíduo não tenha tido contato ou não esteja infectado com dado patógeno, pois os títulos de anticorpos produzidos podem estar abaixo do limite de sensibilidade dos métodos. A avaliação sorológica não possui a capacidade de diferenciar infecção persistente e resolvida (ANDERSON *et al.*, 1998, p.35) ou ainda reativação de infecção latente e reinfeção (ROIIVAINEN *et al.*, 2000, p.252).

Baseado na falta de consenso e no reduzido número de estudos desta natureza em nosso país, resolvemos estudar o aspecto infeccioso da doença coronariana em pacientes do Estado de Santa Catarina, atendidos no HU/UFSC. Nesse estudo foram avaliados sorologicamente a presença de anticorpos IgG e IgM, e títulos de IgG contra cinco microrganismos, que podem estar relacionados com a doença coronariana. A escolha dos microrganismos foi embasada nos dados da literatura, optando-se por estudar aqueles que observamos um foco maior de atenção como HSV-1, CMV, *H. pylori* e *C. pneumoniae*, e uma bactéria mais recentemente associada com DAC, *M. pneumoniae* (ROIIVAINEN *et al.*, 2000, p.252, ESPINOLA *et al.*, 2002, p.2581 e RUPPRECHT *et al.*, 2001, p.25).

Os testes sorológicos foram escolhidos por questões práticas, técnicas e financeiras. A técnica de ELISA é rápida, sensível, reprodutível e simples de ser efetuada (DELARCHE e CHOLLET, 1999, p.475)

A seguir serão feitas considerações individualizadas sobre cada um dos microrganismos testados.

5.1 - HSV-1

No presente estudo, a soropositividade de anticorpos IgG e IgM contra HSV-1 foi de distribuição semelhante entre os grupos (tabela 2). Esse resultado está de acordo com os dados de

RIDKER *et al.*, 1998, p.2796 e ESPINOLA *et al.*, 2002, p.15, que também avaliaram anticorpos (IgG) pela técnica ELISA, e com os resultados de SORLIE *et al.*, 2000, p.2027, obtidos através de radioimunoensaio. Contrastando com nossos resultados, ROIVAINEN *et al.*, 2000, p.252, demonstraram um risco maior de ocorrer doença coronariana em pacientes com altos níveis de IgG para HSV- 1. Esse risco mostrou-se significativamente aumentado nos pacientes que também possuíam concentração sérica elevada de proteína C-reativa, demonstrando a relevância da inflamação na DAC. No nosso estudo, a avaliação dos anticorpos IgG para HSV-1 foi somente de caráter qualitativo, não sendo portanto quantificados. Talvez isso possa explicar a diferença entre nossos resultados e os de ROIVAINEN *et al.*, 2000, p.252. Outro motivo dessa diferença poderia ser a característica clínica dos grupos estudados, já que os pacientes incluídos nesse estudo de ROIVAINEN, tiveram IAM ou morte por evento coronariano, as duas situações extremas da manifestação clínica da doença.

Os estudos de ESPINOLA *et al.*, 2000, p.2127 e 2002, p.2581, demonstram uma associação entre o aumento da espessura da camada íntima de carótida e progressão da aterosclerose em pacientes com altos títulos de IgG contra HSV-2, mas não encontram a mesma associação para HSV-1.

Podemos então sugerir que esses dois vírus pertencentes à família Herpesviridae (HSV-1 e HSV-2), possuem uma relação com a aterosclerose.

De maneira geral os estudos soroepidemiológicos sobre associação de HSV-1 com aterosclerose são contraditórios.

Uma outra abordagem escolhida por alguns autores foi verificar a presença dos vírus HSV-1 e HSV-2 em lesões de placas ateroscleróticas. Embora BENDITT, *et al.*, 1983, p.6386, e GYORKEY, *et al.*, 1984, p.328, tenham encontrado associações positivas, ainda não está claro se

estes patógenos são os agentes causais ou uma decorrência secundária do processo aterosclerótico.

Estudo experimental realizado por FABRICANT *et al.*, 1978, p.673, conseguiu induzir a formação de aterosclerose em galinhas, após infectá-las com um herpes vírus de aves, sugerindo uma associação causal para a doença.

Estudos *in vitro* indicam que infecção latente em células vasculares, por HSV-1, pode ter uma ação patogênica no desenvolvimento da aterosclerose humana (KEY *et al.*, 1990, p. 7095). A infecção por HSV-1 leva ao acúmulo de lipídios em células vasculares e mudanças nas propriedades pró-coagulantes do endotélio, com aumento da geração de trombina e maior adesão às plaquetas (HAJJAR *et al.*, 1987, p.1317). Existe ainda a hipótese de que mecanismos de abrasão podem reativar a infecção latente de HSV-1 nas células endoteliais e ali se instalar um processo inflamatório que culminaria na formação da placa aterosclerótica (JACOB *et al.*, 1992, p.104). Todos estes mecanismos contribuem para esclarecer de que maneira a infecção por HSV-1 poderia gerar ou modular a formação da aterosclerose.

Em humanos no entanto, estudos clínicos, soroepidemiológicos e de biologia molecular (MELNICK *et al.*, 1993, p.30; BAYAD *et al.*, 1993, p.101) embora demonstrem associação, a relação causal ainda não foi confirmada (RUPPRECHT *et al.*, 2001, p.25).

Como o HSV-1 é um agente amplamente distribuído e pessoas portadoras sem manifestação clínica podem ter sorologia positiva, a observação de diferenças entre os grupos de pacientes doentes e controles, quanto sua prevalência e seus efeitos sobre a aterosclerose fica prejudicada.

5.2 - Citomegalovírus

A soropositividade para anticorpos IgM e IgG contra CMV, no presente estudo foi semelhante em todos os grupos (tabela 2). Quanto à positividade de IgM, esses resultados corroboram o estudo de GARCIA *et al.*, 2001, p.453, que pesquisaram estes anticorpos em uma população espanhola, com síndrome coronariana aguda. Em relação aos anticorpos IgG, os resultados do presente estudo confirmam as observações de ANDERSON *et al.*, 1998, p.35, RIDKER *et al.*, 1998, p.2796 e MAYR *et al.*, 2000, p.833, que não encontraram associação entre soropositividade de anticorpos IgG contra CMV e DAC. RUPPRECHT *et al.*, 2001, p.25, num estudo de acompanhamento, avaliando o risco de ocorrer morte por eventos coronarianos e soropositividade para agentes infecciosos, não encontram associação com CMV. A alta prevalência e ampla distribuição desse vírus na população adulta e idosa (MELNICK, 1990, p.2204), poderia explicar certa dificuldade em observar diferenças de soroprevalência no nosso estudo e nos demais.

Contrastando com nossos resultados, BLANKENBERG *et al.*, 2001, p.2915, demonstraram que soropositividade para CMV, em pacientes com IL-6 elevada, promoveu um aumento no risco de ocorrer morte futura por eventos cardíacos. Entretanto, nos pacientes que apresentavam baixos níveis séricos de IL-6 e soropositividade para CMV, esse aumento não foi demonstrado, reforçando a importância e necessidade de um estado inflamatório nos eventos coronarianos agudos. Embora esse tipo de análise não tenha sido feita no presente estudo, a correlação entre marcadores inflamatórios e infecciosos pode fornecer informações importantes sobre o processo aterosclerótico e sobre o valor preditivo para doença.

Os valores de títulos de IgG não demonstraram diferenças entre os grupos, quando analisamos valores das médias e distribuição em quartis (figura 3 e 4). Altos títulos de IgG foram encontrados em todos os grupos, sem maior prevalência em algum deles. Nossos resultados

confirmam os estudos de ESPINOLA *et al.*, 2002, p.2581, e de ROIVAINEN *et al.*, 2000, p.252. Porém, outros estudos revelam resultados distintos, SORLIE *et al.*, 2000, p.2027, num estudo de acompanhamento, mostraram aumento no risco relativo para DAC, na população com níveis mais altos de anticorpos IgG contra CMV. BLUM *et al.*, 1998, p.866, demonstraram prevalência similar para soropositividade de CMV, nos grupos de doentes e controles, no entanto pacientes com altos títulos de IgG foram encontrados com maior frequência no grupo com DAC que em controles. Além disso, também demonstraram que pacientes com altos títulos de IgG tinham risco maior para desenvolver restenose após angioplastia, que pacientes com baixos títulos submetidos ao mesmo procedimento. ESPINOLA *et al.*, 2000, p.2127, estudando a espessura da camada íntima de artérias carótidas, por ultra-sonografia, demonstraram que pacientes com altos títulos de IgG e IgA contra CMV, tinham um aumento na espessura da camada íntima da carótida e o mesmo ocorreu para títulos de anticorpos contra HSV-2. Diante desses resultados podemos perguntar se o processo inflamatório resultante da infecção poderia causar esse aumento? A resposta seria provavelmente sim, desde que se tenha comprovado a infecção da placa por esse agente, o que não pode ser feito através de estudos soroepidemiológicos, e mesmo depois de comprovada essa infecção, ainda podemos especular se ela encontra-se ativa e capaz de estimular vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, expressão de moléculas de adesão, infiltrado celular, produção de citocinas e outros eventos inflamatórios envolvidos na aterosclerose; pois seria a infecção latente capaz de causar essas mudanças no vaso arterial?

Apesar da contradição de estudos soroepidemiológicos sobre associação entre infecção por CMV e DAC, a presença desse vírus na placa aterosclerótica foi confirmada através de estudos histopatológicos que demonstraram a presença de antígenos e material genético de CMV em lesões ateroscleróticas. CHIU *et al.*, 1997, p.2144, realizando estudo histopatológico, detectaram antígenos de CMV em 35,5% das amostras de lesões ateroscleróticas de carótida. Usando a

técnica de PCR, HENDRIX *et al*, 1990, p.23, detectaram material genético de CMV em 90% das amostras de parede arterial de pacientes com severa aterosclerose e em 53% de amostras de pacientes com aterosclerose menos severa. Além disso, a presença de CMV foi também confirmada, através da detecção de seu ácido nucleico (principalmente por hibridização *in situ* e imunohistoquímica) em lesões ateroscleróticas de aorta abdominal, femural, artérias coronárias e também em amostras de pacientes controles. YAMASHIROYA, *et al.*, 1988, p.71, demonstraram a presença de CMV em tecido arterial de pessoas jovens, vítimas de traumas, sem evidências de doença coronariana. MELNICK *et al*, 1983, p.644, cultivaram células musculares lisas de placas da carótida e detectaram por imunohistoquímica, CMV em 25% das células cultivadas; no entanto, não observaram replicação do vírus por microscopia eletrônica. Esses dados sugerem que a parede arterial pode ser um sítio de infecção latente para CMV em pessoas com e sem doença coronariana.

A infecção por CMV pode agir através de vários mecanismos para promover aterosclerose ou agravar o processo inflamatório na placa. Esse vírus pode infectar células endoteliais humanas e alterar funções relacionadas com o processo aterosclerótico, como o balanço pró-coagulante do endotélio (DAN-MIERAS *et al.*, 1987, p.69). Recentes evidências sugerem uma outra maneira específica pela qual CMV pode influenciar a lesão endotelial. A infecção por esse vírus resultaria no seqüestro e conseqüente inibição de uma proteína produzida pelo gene p53, responsável pela reparação do DNA, supressão de tumores e inibição da progressão do ciclo celular. Esse seqüestro se daria pela formação de um complexo com a proteína viral do gene IE84 (KOVACS *et al.*, 1996, p.1531). Desta forma, CMV poderia estar contribuindo para formação da placa aterosclerótica, principalmente se puder induzir a proliferação celular. Nesse contexto, SPEIR *et al*, 1994, p.391, sugerem que a ativação de infecção latente vascular por CMV, teria alguma influência na proliferação celular anormal observada em reestenoses. Alteração na produção de

citocinas por células vasculares infectadas com CMV, também pode promover aterogênese por afetar várias funções vasculares relacionadas a aterosclerose e reestenose (LIBBY, EGAN e SKARLATOS, 1993, p.4095). *In vitro*, infecção com CMV pode induzir a expressão de TNF-alfa em monócitos humanos (SMITH *et al.*, 1992, p.1642), alterar a produção de interleucina-6 em células endoteliais (ALMEIDA, PORADA e JEOR, 1994, p.370) e induzir a expressão endotelial de moléculas de adesão de leucócitos como a ICAM-1 (SEDMAN, 1994, p.1379).

5.3 - *Helicobacter pylori*

No presente estudo, a soropositividade de anticorpos IgM contra *H. pylori* foi significativamente maior nos pacientes com AI que nos pacientes com AE (tabela 2). Esse dado sugere que infecção aguda por *H. pylori* pode ter alguma influência sobre o quadro clínico mais severo dos pacientes com doença coronariana. Embora essa mesma relação não tenha sido encontrada com pacientes do grupo controle, por motivos ainda à esclarecer, essa análise mostrou-se interessante por destacar a prevalência de infecção aguda em síndromes isquêmicas agudas.

Marcadores de infecção passada (IgG), não se mostraram úteis para diferenciar os três grupos estudados (tabela 2 e figura 5), sugerindo que infecção crônica por *H. pylori* não afeta o desenvolvimento da aterosclerose ou aumenta o risco para ter a doença. Embora tenhamos observado títulos mais altos de IgG nos pacientes com angina estável, essa diferença foi encontrada apenas em relação aos pacientes com angina instável. Uma possível explicação para esse fato seria que os pacientes com angina estável foram mais recentemente infectados com *H. pylori*, e após controle da infecção, os títulos de IgG diminuíram. Nossos resultados para soropositividade de IgG (figura 2) corroboram o estudo de FOLSON *et al.*, 1998, p.845, quanto à soroprevalência e chances de ocorrer DAC (*odds ratio*). Esses autores, porém, não pesquisaram

anticorpos IgM. Diferentes foram os resultados encontrados por RUPPRECHT *et al*, 2001, p.25, que demonstraram associação entre soropositividade de IgG para *H. pylori* e risco futuro de morte por eventos cardíacos; e PATEL *et al.*, 1995, p.711, que observaram aumento no risco para ocorrência de eletrocardiograma com sinais de DAC, nos pacientes soropositivos para *H. pylori*. PASCERI, *et al*, 1998, p.1675, também demonstraram maior prevalência de infecção por *H. pylori* no grupo de DAC que nos controles. Além disso, esse estudo foi o primeiro a demonstrar maior prevalência de uma cepa virulenta de *H. pylori* (cepa CagA) nos pacientes com doença cardíaca isquêmica que em controles e encontraram um risco aumentado para ocorrer doença cardíaca isquêmica nos pacientes soropositivos para essa cepa. A cepa estudada por esses autores expressa o gene A associado com produção de citotoxinas (apud PASCERI, *et al*, 1998, p.1675). Os autores afirmam que seus resultados fortalecem a hipótese de que há ligação entre infecção por *H. pylori* e doença cardíaca isquêmica.

De acordo com nossos resultados (tabela 2), a ativação de um processo infeccioso agudo, causado por *H. pylori*, é um fator que pode estar ligado à síndromes isquêmicas agudas em pacientes com doença coronariana, mas não em pacientes sem evidências clínicas dessa doença. Isto reforça a hipótese de que os efeitos da infecção por esse agente, poderiam agravar o processo aterosclerótico em andamento, mas não seriam suficientes para originá-lo. Uma possível explicação para maior soropositividade de IgM no grupo AI que no grupo AE, seria que parte dos pacientes do grupo AE que tiveram infecção aguda por *H. pylori*, instabilizaram o processo aterosclerótico e foram enquadrados como síndrome isquêmica aguda, quando atendidos no hospital.

Os mecanismos pelos quais infecção por *H. pylori* pode influenciar o risco de doença coronariana são desconhecidos (PATEL *et al.*, 1995, p.711). No entanto, alguns autores tentam explicar como a infecção por esse agente poderia se relacionar com a doença. LAURILA *et al*,

1999, p.207, encontraram concentrações séricas elevadas de triglicerídeos e colesterol total em pacientes soropositivos para IgG e IgA contra *H. pylori*, quando comparados com pacientes sem sinal de infecção. Esses dados sugerem que a infecção crônica por esse agente pode modificar o perfil de lipídios séricos e assim aumentar o risco para DAC. Os efeitos da infecção gástrica por *H. pylori*, em marcadores inflamatórios como fibrinogênio, proteína C-reativa e número total de leucócitos, são mediados via citocinas, como o fator de necrose tumoral-alfa e a interleucina-6, que estão aumentadas devido à infecção por esse agente (CABTREE *et al.*, 1991, p.1473). PATEL *et al.*, 1995, p.711, hipotetizaram que a inflamação ligada a infecção crônica por *H. pylori*, pode aumentar o risco para DAC, por induzir o aumento de fibrinogênio, proteína C-reativa e do número de leucócitos totais. Ainda nesse contexto, MIRAGLIOTTA, DEL PRETE e MOSCA, 1994, p.751, mostraram que infecção por *H. pylori* pode estimular atividade pró-coagulante dos leucócitos.

De maneira geral, os resultados sobre associação de *H. pylori* com doença coronariana são inconclusivos. Esse fato em parte pode ser explicado pela forte associação entre infecção por *H. pylori* e fatores de risco, como classe social baixa, que podem confundir os resultados (MAYR *et al.*, 2000, p.833). WHINCUP *et al.*, 1996, p.568, estudando 135 casos de IAM e 136 controles encontraram um risco maior para ocorrer IAM nos pacientes soropositivos (IgG) para *H. pylori*, mas após fazer o ajuste para o fator de risco baixa classe social, essa associação deixou de existir.

No presente estudo o fator de baixa classe social foi encontrado em todos os grupos de forma semelhante, pois a maioria dos pacientes atendidos pelo Sistema Único de Saúde são de baixa renda, assim nossos resultados não foram influenciados por esse fator.

5.4 - *Chlamydia pneumoniae*

A análise dos resultados para soropositividade de anticorpos IgM e IgG e para títulos de IgG contra *C. pneumoniae*, não detectou diferença entre os grupos (tabela 2 e figura 6). Portanto não foram encontradas associação entre infecção aguda ou crônica por *C. pneumoniae* e doença coronariana. Estes resultados corroboram os de RIDKER *et al.*, 1999, p.1161, e de RUPPRECHT *et al.*, 2001, p.25, que não encontraram associação entre infecção por *C. pneumoniae* e risco futuro de IAM e de morte por eventos cardíacos, respectivamente. PRAZERES *et al.*, 2003, p.171, também não encontraram associação entre soropositividade para IgG contra *C. pneumoniae* e DAC. Estes autores, no entanto, avaliaram a associação entre infecção por *C. pneumoniae* e eventos trombóticos precoces após angioplastia com colocação de *stent* coronário; o que já tinha sido demonstrado anteriormente para CMV (NEUMANN *et al.*, 2001, p.2085).

Outros estudos também não demonstraram associação entre infecção por *C. pneumoniae* e DAC, como os de ANDERSON *et al.*, 1998, p.35 e ZHU *et al.*, 2000, p.140. Contrastando com estes resultados, PATEL *et al.*, 1995, p.711, demonstraram aumento no risco de doença coronariana, através de sinais eletrocardiográficos, nos pacientes soropositivos para *C. pneumoniae*. ESPINOLA *et al.*, 2002, p.15, demonstraram associação entre soropositividade para *C. pneumoniae* e progressão da aterosclerose, determinada angiograficamente pelo acometimento de dois ou mais vasos. No trabalho destes autores porém, a associação entre DAC e soropositividade foi determinada através de anticorpos IgA, os quais não foram incluídos no presente estudo. Quando fizeram essa relação com anticorpos IgG, eles também não encontraram diferença entre os grupos.

Pode-se especular que anticorpos IgA seriam melhores marcadores que IgG para este tipo de análise. No entanto, outros dois estudos, feitos por ESPINOLA *et al.*, 2000, p.2127 e 2002, p.2581, analisando aterosclerose de carótida por ultra-sonografia, demonstraram resultados

contraditórios em relação à associação de títulos elevados de IgA e IgG contra *C. pneumoniae* e aumento da espessura da camada íntima da artéria carótida. No primeiro houve associação com IgG mas não com IgA e no outro estudo os houve associação com IgA, mas não com IgG.

Esses dados mostram que ainda não há um consenso sobre qual dessas classes de anticorpos representaria melhor a possível ligação entre infecção por *C. pneumoniae* e aterosclerose, se é que ela existe. Um estudo de meta análise feito por DANESH *et al.*, 2002, p.371, no qual avaliaram estudos prospectivos sobre associação de IgG e IgA com doença coronariana, não encontraram forte valor preditivo de títulos de IgG ou IgA, para essa doença.

SCHUMACHER *et al.*, 2002, p.153, demonstraram associação entre soropositividade de anticorpos IgA contra *C. pneumoniae* e níveis elevados de TNF-alfa, em pacientes com doença coronariana, sugerindo que a infecção pode contribuir para aumentar a inflamação vascular nos pacientes doentes. Sabe-se que lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular de bactérias é um potente estímulo inflamatório, conhecido por induzir ativação de macrófagos (BEUTLER e KRUY, 1992, p.1). Numa placa aterosclerótica infectada por *C. pneumoniae*, o LPS de parede celular poderia exercer um estímulo contínuo para ativação de macrófagos. KALAYOGLU e BYRNE, 1998, p.5067, demonstraram *in vitro*, um aumento significativo na formação de células espumosas, após infecção de macrófagos com *C. pneumoniae*.

A presença de *C. pneumoniae* na placa aterosclerótica foi confirmada por vários estudos, através das técnicas de imunohistoquímica (CHIU *et al.*, 1997, p.2144), PCR (CHIERICHETTI *et al.*, 2000, p.827; FARSAK *et al.*, 2000, p.4408) e por microscopia eletrônica (HIGUCHI *et al.*, 2000, p.1023). Essa bactéria intracelular pode causar infecção crônica e ativar células *killers* diretamente ou via produção de interleucina-12 e assim induzir resposta imune celular por dois mecanismos: ativação de macrófagos através da liberação de citocinas derivadas de linfócitos Th1 e/ou lise de células infectadas pelos linfócitos TCD8 (WARD, M.E., 1995, p.769).

Além disso, existem algumas evidências que sugerem envolvimento de reações autoimunes para proteínas *heat shock*, com progressão da aterosclerose (XU e WICK, 1996, p.372). As proteínas *heat shock*, são proteínas expressadas na superfície celular. Nas células da parede vascular podem ser induzidas por vários estímulos como infecção, estresse hemodinâmico, agentes oxidantes e citocinas. Ao longo da evolução biológica essas proteínas foram muito conservadas e estão presentes em vários organismos, tanto em bactérias quanto nos mamíferos, favorecendo aparecimento de reações cruzadas de anticorpos responsáveis pela citotoxicidade vascular (MAYR *et al.*, 2000, p.833).

A resposta imune humoral contra *C. pneumoniae* está relacionada com proteínas *heat shock*. Essa resposta pode ter influência importante no processo de injúria vascular, um evento chave na patogênese da aterosclerose (MAYR *et al.*, 1999, p.1560). Estudo em camundongos feito por MARON *et al.*, 2002, p.1708, demonstrou redução no tamanho da placa aterosclerótica e aumento da produção de interleucina-10, uma citocina anti-inflamatória, nos animais que receberam imunização nasal (para indução de tolerância) com uma proteína *heat shock* (HSP65) de *C. pneumoniae*. Esses dados sugerem que a indução de tolerância imunológica à esse tipo de proteínas reduz o processo inflamatório associado com aterosclerose, permitindo vislumbrar novas perspectivas para estudar e tratar a doença aterosclerótica.

5.5 - *Mycoplasma pneumoniae*

Avaliando os resultados de soropositividade para anticorpos IgM, não foi encontrada associação entre infecção aguda e doença coronariana (tabela 2). O fato dessa bactéria ser um patógeno comum do trato respiratório (FOY, H.M. 1993, p.37) pode ajudar a explicar porque os pacientes do estudo, na maioria idosos, não possuem evidências de infecção aguda por *M. pneumoniae*, representada pela presença de IgM.

No entanto, os resultados de anticorpos IgG foram mais interessantes. Pacientes positivos para IgG apresentaram risco muito maior para doença coronariana que pacientes soronegativos (tabela 3). Além disso, a porcentagem de soropositividade foi maior nos pacientes em estágio crônico da doença (AE) (tabela 2), sugerindo uma relação entre infecção crônica por esse agente (determinada pela presença de IgG) e doença coronariana crônica. Podemos interpretar esta associação de duas maneiras. Na primeira, baseando-se na sintomatologia clínica desses pacientes, pode-se pensar que a infecção por *M. pneumoniae* esteja estabilizando o processo aterosclerótico, de alguma forma a ser esclarecida. Uma segunda interpretação, levando-se em consideração uma seqüência de eventos, $C \rightarrow AE \rightarrow AI$, seria que pacientes com angina estável sejam mais recentemente infectados com *M. pneumoniae*, tendo portanto maiores chances de apresentar anticorpos contra este agente, quando comparados com pacientes com angina instável, que já teriam diminuído os níveis séricos deste marcador, ou até mesmo perdido esse parâmetro de avaliação. Assim, a associação DAC e *M. pneumoniae* estaria mais relacionada com o início do processo do que com a instabilização do mesmo.

RUPPRECHT *et al*, 2001, p.25, estudando pacientes com diagnóstico de DAC, por angiografia, não demonstraram associação entre soropositividade para *M. pneumoniae* e risco futuro de morte por eventos cardíacos, negando a relação entre esse agente e doença coronariana. Contradizendo estes resultados, pode-se citar o estudo de HIGUCHI e RAMIRES, 2002, p.217, que sugerem que este patógeno seja um co-fator para instabilidade da placa. Além disso, altas porcentagens de soropositividade para esse agente em pacientes com doença crônica, não têm sido demonstradas por outros estudos (ESPINOLA *et al.*, 2002, p.2581; ESPINOLA *et al.*, 2002, p.15).

No presente estudo, também foi demonstrado a relação entre títulos de anticorpos contra *M. pneumoniae* e DAC. Os pacientes com doença coronariana (AE+AI) (tabela 4) e os pacientes

com doença crônica (AE) (figura 7), apresentaram média de títulos mais altos que os controles, demonstrando que não apenas a presença de anticorpos contra o agente infeccioso, mas também os níveis destes anticorpos se relacionam com aterosclerose. Esses resultados, no entanto, são contrários a um estudo de acompanhamento feito por ESPINOLA *et al*, 2002, p.15, no qual os pacientes de doença crônica não demonstravam associação entre títulos de anticorpos contra *M. pneumoniae* e progressão da aterosclerose em artérias carótidas e coronárias. Estes dados se repetiram em estudo posterior (ESPINOLA *et al.*, 2002, p.2581), que avaliou a progressão de aterosclerose em carótidas, pelo aumento na espessura da camada íntima e aumento de estenose, através de ultra-sonografia.

A presença de *M. pneumoniae* na placa aterosclerótica foi detectada por HIGUCHI *et al.*, 2000, p.1023, que também detectou a presença de *C. pneumoniae* nesse mesmo estudo, examinando lesões ateroscleróticas por microscopia eletrônica e confirmando os resultados por hibridização *in situ*. Este estudo foi o primeiro a demonstrar visualmente (por microscopia eletrônica), *M. pneumoniae* em associação com *C. pneumoniae* na placa aterosclerótica. Em artigo de revisão, HIGUCHI e RAMIRES, 2002, p.217, abordando aspectos histológicos de instabilidade da placa, identificaram infecção concomitante por esses agentes como um co-fator para instabilidade da placa.

Em nosso estudo, pacientes soropositivos para ambas bactérias, *M. pneumoniae* e *C. pneumoniae*, não demonstraram risco maior para DAC que pacientes soronegativos para ambas (dados não mostrados). É interessante ressaltar que *M. pneumoniae* necessita de colesterol para sua sobrevivência, utilizando-o na síntese de sua membrana (RAZIN, YOGEV e NAOT, 1998, p.1094). Esse fato pode ajudar a explicar o grande número de microrganismos encontrados dentro do núcleo lipídico da placa aterosclerótica, podendo-se especular sobre sua ação na ativação de macrófagos, causando liberação de altos níveis de citocinas e talvez induzindo apoptose

(HIGUCHI *et al.*, 2000, p.1023). *M. pneumoniae* é capaz de secretar radicais livres como peróxido de hidrogênio e radicais superóxidos, causando assim possíveis danos à membrana da célula hospedeira, onde permanece aderido (ALMAGOR, KAHANE e YATZIV, 1984, p.8452).

Quando analisamos a distribuição dos títulos de anticorpos contra *M. pneumoniae*, por quartis, observamos uma frequência significativamente maior de pacientes com doença coronariana no quartil superior. Essa relação é confirmada quando demonstramos aumento no risco para ter doença coronariana nos pacientes que se encontram no quartil superior para títulos de anticorpos (figura 4). Entre os pacientes que se encontravam no quartil superior, a maioria pertenceu ao grupo AE, reafirmando o envolvimento da infecção por esse agente com doença coronariana crônica.

Frente à esses resultados, fica evidente a associação sorológica entre anticorpos IgG contra *M. pneumoniae* e doença coronariana. Sendo assim, afirma-se o envolvimento desse patógeno, por meios ainda não totalmente esclarecidos, mas de forma intensa com pacientes portadores crônicos da doença coronariana.

5.6 - Carga de Patógenos

Alguns estudos indicam que infecções concomitante podem estar associadas com DAC. ANDERSON *et al.*, 1998, p.32, demonstraram aumento no risco para DAC nos pacientes soropositivos para duas bactérias, *C. pneumoniae* e *H. pylori*, o que não aconteceu nos pacientes soropositivos para apenas uma delas. ESPINOLA *et al.*, 2002, p.15, observaram associação entre extensão da aterosclerose (determinada angiograficamente e por ultra-sonografia) e maior número de infecções concomitantes. Outros autores demonstraram que carga de patógenos se relaciona independentemente com risco de ocorrer DAC (ZHU *et al.*, 2000, p.140) e morte por eventos cardiovasculares (RUPPRECHT, 2001, p23). ESPINOLA *et al.*, 2002, p.2581, relataram

que a associação entre carga de patógenos e progressão da aterosclerose, se mantinha após ajuste para proteína C-reativa, sugerindo essa proteína não seria um fator para confundir os resultados.

Alguns mecanismos foram propostos para justificar a associação entre infecção e aterosclerose, de acordo com ZHU *et al.*, 2000, p.140, através da resposta inflamatória crônica, infecção por vários patógenos pode predispor o surgimento do processo aterosclerótico. Nesse contexto, PRASSAD *et al.*, 2002, p.184, demonstram em humanos, que disfunção endotelial induzida seria um possível mecanismo pelo qual infecções múltiplas poderiam predispor o processo aterogênico.

No presente estudo, o número de patógenos aos quais o indivíduo esteve exposto, não demonstrou relação com o risco de ocorrer DAC (figura 8). Desse modo, podemos sugerir que infecções por múltiplos patógenos não afetariam o processo aterosclerótico. No entanto, esse tipo de interpretação precisa ser cautelosa. Avaliar infecção crônica através de sorologia, não implica em assumir que o agente está ausente no organismo, mas sim que não houve produção de anticorpos significante naquele momento, para que eles sejam detectados. Desta forma, existe a possibilidade de vários patógenos estarem presentes na placa aterosclerótica, como infecções latentes ou não, e não serem detectados sorologicamente. CHIU *et al.*, 1997, p.2144, demonstraram a porcentagem de pacientes com antígenos de CMV ou *C. pneumoniae*, detectados em placa aterosclerótica de carótida, que não apresentavam títulos de anticorpos para esses agentes (44,4% e 18,5% respectivamente).

Apesar de não ter sido demonstrada associação entre carga de patógenos e DAC, não podemos negar todas as evidências fornecidas pelos autores acima citados. Portanto, podemos ao menos reconhecer que os mecanismos pelos quais infecção afetaria o processo da aterosclerose, desde sua origem até o desfecho final com ruptura da capa fibrosa, podem ocorrer de maneiras distintas. Uma delas seria referente aos efeitos da inflamação sistêmica que podem alterar as

propriedades pró-coagulantes do sangue e endotélio, outra seria pelo efeito da inflamação local dentro da placa aterosclerótica, predispondo-a à ruptura, ou ainda, pela indução de uma resposta autoimune envolvendo reação cruzada de anticorpos contra proteínas *heat shock*.

Perspectivas

Em estudos futuros pretendemos ampliar a avaliação da ligação entre processo inflamatório aterosclerótico com processos infecciosos. Embora tenha sido encontrada associação entre a presença de anticorpos contra *M. pneumoniae* e DAC, deve-se considerar o número limitado de pacientes.

Uma possível abordagem para tentar avaliar o efeito de infecções na aterosclerose, seria a realização não apenas de estudos observacionais, mas também de estudos randomizados, em pequena escala, de intervenção para observar os possíveis efeitos do tratamento antiviral e/ou antibacteriano na prevenção de eventos trombóticos agudos. Um estudo feito por STONE *et al.*, 2002, p.1219, demonstrou redução significativa de eventos coronarianos em pacientes com síndrome isquêmica aguda, que receberam tratamento com antibacterianos (amoxicilina, azitromicina e metronidazol) por uma semana após admissão hospitalar devida à infarto agudo do miocárdio ou angina instável. Outros estudos dessa natureza são necessários para confirmar ou não esses resultados e observar a relação custo/benefício do uso de antibióticos na prevenção e/ou tratamento da DAC.

6 - CONCLUSÕES

A partir dos resultados sorológicos dos pacientes com Angina Instável, Angina Estável e Controles deste estudo, podemos concluir que:

- A soropositividade para *H. pylori* (IgM) foi significativamente maior em pacientes com Angina Instável, quando comparados com grupo de Angina Estável e a soropositividade para *M. pneumoniae* (IgG) foi significativamente maior em pacientes com Angina Estável, quando comparados com grupo Controle.
- Foi demonstrado maior risco para DAC em pacientes soropositivos (IgG) para *M. pneumoniae*. A média dos títulos foi significativamente maior nos pacientes com DAC, quando comparados com grupo Controle.
- A carga de patógenos, considerada como a somatória das soropositividades (IgG) dos cinco patógenos aqui estudados, não demonstrou associação com DAC.

7 - REFERÊNCIAS

- ALMAGOR, M.; KAHANE, I.; YATZIV, S. Role of superoxide anion in host cell injury induced by *M. pneumoniae* infection. A study in normal and trisomy 21 cells. **J. Clin. Invest.** **73**:842-847, 1984.
- ALMEIDA, G.D.; PORADA, C.D.; JEOR, S.; *et al.* Human *Cytocegalovirus* alters interleukin-6 production by endothelial cells. **Blood** **83**:370-76, 1994.
- ANDERSON, J.L.; CARLQUIST, J.F.; MUHLESTEIN, J.B.; *et al.* Evaluation of C-reactive protein, an inflammatory marker, and infectious serology as risk factors for coronary artery disease and myocardial infarction. **J. Am. Coll. Cardiol.** **32**:35-41, 1998.
- ARROY, L.H.; LEE, R.T. Mechanisms of plaque rupture: Mechanical and biologic interactions. **Cardiovasc. Res.** **41**:369-375, 1999.
- BADMON, J.J.; FUSTER, V.; CHESEBRO, J.H.; *et al.* Coronary atherosclerosis: a multifactorial disease. **Circulation** **87**(2):3-15.
- BAYAD, J.; GALTEAU, M.M.; SIEST, G. Viral theory of atherosclerosis. Role of Cytomegalovirus. **Ann. Biol. Clin.** **51**:101-7, 1993.
- BENDITT, E.P.; BARRETT, T.; MCDOUGALL, J.K. Viruses in the etiology of atherosclerosis. **Proc. Natl. Acad.** **80**:6386-89, 1983.
- BERLINER JÁ, TERRITO MC, SEVANIAN A, *et al.* Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. **J. Clin. Invest.** **85**:1260-60, 1990.
- BEUTLER, B.; KRUIS, V. Lipopolysaccharide signal transduction, regulation of tumor necrosis factor biosynthesis, and signaling by tumor necrosis factor biosynthesis, and signaling by tumor necrosis factor itself. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** **25**(2):1-8, 1992.

BIASUCCI, L.M.; VITELLI, A.; LIUZZO, G.; *et al.* Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. **Circulation** **94**(5): 874-877, 1996.

BLANKENBERG, S.; RUPPRECHT, H.J.; POEIRET, O.; *et al.* Cytomegalovirus infection with interleukin-6 response predicts cardiovascular mortality in patients with coronary artery disease. **Circulation** **103**:2915-921, 2001.

BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Lipoprotein metabolism in macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. **Ann. Rev. Biochem.** **52**:233-41, 1983.

CHARO, I.F. Monocyte-endothelial cell interactions. **Curr. Opin. Lipidol.** **3**:335-43, 1992.

CRABTREE, J.E.; SHALLCROSS, T.M.; HEATLEY, R.V.; *et al.* Mucosal tumour necrosis factor and interleukin-6 in patients with Helicobacter pylori associated gastritis. **Gut.** **32**:1473-77, 1991.

CHIU, B.; VIIRA, E.; TUCKER, W.; *et al.* Chlamydia pneumoniae, Cytomegalovirus e Herpes Simplex Virus in atherosclerosis of the carotid artery. **Circulation** **96**(7):2144-148, 1997.

COSTA EA, KLEIN CH. Meio urbano e doenças cardiovasculares. **Cad. S. Públ.** **1**:305-12, 1985.

VAN DAM-MIERAS, M.C.; BRUGGEMAN, C.A.; MULLER, A.D.; *et al.* Induction of endothelial cell procoagulant activity by cytomegalovirus infectio. **Thromb. Res.** **47**:69-75, 1987.

D'ANGELO, A.; SELHUB, J. Homocysteine and thrombotic disease. **Blood** **90**:1-11, 1997.

DELARCHE, C.; CHOLLET-MARTIN, S.. Plasma cytokines: what we are measuring. **Cur. Opin. Clin. Nutr. Metabol. C.** **2**:475-9, 1999.

DELLERY, C.M.; MCEWAN, J.R.; HENNEY, A.M. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. **Circ. Res.** **77**:863-8, 1995.

- DRUMMOND, J.P.; SILVA, E. **Medicina baseada em evidências**. Editora Atheneu, S.P.- 1ª ed., 1999.
- DUSTIN, M.L.; ROTHELEIN, R.; BHAN, A.K.; *et al.* Induction by IL-1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). **J. Immunol.** **137**:245, 1986.
- ENDEMANN, G.; STANTON, L.W.; MADDEN, K.S.; *et al.* CD 36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. **J. Biol. Chem.** **268**:118-116. 1993.
- ESPINOLA, C.K.; RUPERCHT, H.J.; BLANKENBERG, S.; *et al.* Are morphological or functional changes in the carotid artery wall associated with *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, Cytomegalovirus or Herpes simplex-1 virus infection? **Stroke** **31**:2127-33, 2000.
- ESPINOLA, C.K.; RUPERCHT, H.J.; BLANKENBERG, S.; *et al.* Impact of infectious burden on extent and long-term prognosis of atherosclerosis. **Circulation** **105**(1):15-21, 2002.
- ESPINOLA, C.K.; RUPERCHT, H.J.; BLANKENBERG, S.; *et al.* Impact of infectious burden on progression of carotid atherosclerosis. **Stroke** **33**(11):2581-86, 2002.
- FABRICANT, C.G.; FABRICANT, J.; LITRENTA, M.M. *et al.* Virus-induced atherosclerosis. **J. Exp. Med.** **148**:335-40, 1978.
- FARSAK, B.; YILDIRIR, A.; AKYON, Y.; *et al.* Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* DNA in human atherosclerotic plaques by PCR. **J. Clin. Microbiol.** **38**(12):4408-11, 2000.
- FOY, H.M. Infections caused by *Mycoplasma pneumoniae* and possible carrier state in different populations of patients. **Clin. Inf. Dis.** **1**:37-47, 1993.
- FOLSOM, A.R.; NIETO, F.; JAVIER, M.D.; *et al.* *Helicobacter pylori* seropositivity and coronary heart disease incidence. **Circulation** **98**(9):845-50, 1998.

FUSTER, V.; LEWIS, A. Conner Memeorial Lecture. Mechanisms Leading to myocardial infarction: Insights from studies of vascular biology. **Circulation** **90**:2126-2146, 1994.

GARCIA, J.B.; MARTINEZ, M.M.; RODRIGUEZ, J.F.M.; *et al.* Inflamación e infección en la enfermedad coronaria estable y en el síndrome coronario agudo. **Rev. Esp. Cardiol.** **54**:453-59, 2001.

GIANNINI, S.D. Aterosclerose e Dislipidemias: Clínica e terapêutica. Editora BG Cultural, S.P., 1ª ed., 1998.

GILLIGAN, D.M.; QUYYUMI, A.A.; CANNON, R.O. Effects of physiological levels of estrogen on coronary vasomotor function in postmenopausal Women. **Circulation** **89**:2545-551, 1994.

GLASSER SP, SELWYN AF, GANZ P. Atherosclerosis: risk factors and the vascular endothelium. **Am. Hearth J.** **131**:379, 1996.

GRAYSTON, J.T.; ALDOUS, M.B.; EASTON, A.; *et al.* Evidence that Chlamydia pneumoniae causes pneumonia and bronchitis. **J. Infect. Dis.** **168**:1231-35, 1993.

GUIMARÃES, A. Cardiopatia coronária - aspectos epidemiológicos e preventivos. **Arq. Bras. Cardiol.**, **59**:5-11, 1992.

GYORKEY, F.; MELNICK, J.L.; GUINN, G.A.; *et al.* Hesper viridae in the endothelial and smooth muscle cells of the proximal aorta of atherosclerotic patients. **Exp. Mol. Pathol.** **40**:328-39, 1984.

HAJJAR, D.P.; POMERANTZ, K.B.; FALCONE, D.J.; *et al.* Herpes simplex virus infection in human arterial cells. Implications in arteriosclerosis. **J. Clin. Invest.** **80**:1317-21, 1987.

HANSSON, G.K.; HONASSON, L.; HOLM, J.; *et al.* Gamma-interferon regulates vascular smooth muscle proliferation and antigen wxpression in vivo and in vitro. **Circulation Research** **63**:712-19, 1988.

HANSSON, G.K. Immune and inflammatory mechanisms in the development of atherosclerosis. **Br Heart J**, **69**(suppl):38-41, 1993.

HEINSCH, R.H. Caracterização de respostas inflamatórias e imune e valor prognóstico de citocinas inflamatórias em pacientes com doença arterial coronariana. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

HENDRIX, M.G. DORMANS, P.H., KITSLAAR, P.; *et al.* The presence of cytomegalovirus nucleic acids in arterial walls of atherosclerotic and nonatherosclerotic patients. **Am. J. Pathol.** **134**:1151-57, 1989

HENDRIX, M.G.; SALIMANS, M.M.; BOVEN, C.P.; *et al.* Hight prevalence of latently present cytomegalovirus in arterial walls of patients suffering from grade III atherosclerosis. **Am. J. Pathol.** **136**:23-8, 1990.

HIGUCHI, M.L. E RAMIRES, J.A.F. Infectious agents in coronary atheromas: a possible role in the pathogenesis of plaque rupture and acute myocardial infarction. **Rev. Inst. Med. Trop. S. P.** **44**(4):217-224, 2002.

HIGUCHI, M.L.; SAMBIASE, N.; PALOMINO, S.; *et al.* Detection of Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae in ruptured atherosclerotic plaques. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **33**(9):1023-1026, 2000.

HIND, C.H.R.; PEPYS, M.B. The role of serum C-reactive protein measurement in clinical practice. **Int. Med.** **5**:112-51, 1984.

HORNE, B.D.; MUHLESTEIN, J.B.; CARISQUIST, J.F.; *et al.* IgA seropositivity to Mycoplasma pneumoniae predicts the diagnosis of coronary artery disease. **J. Am. Coll. Cardiol.** **35**:321, 2000.

JACOB, H.S.; VISSER, M.; KEY, N.S.; *et al.* Herpes virus infection of endithelium: new insights into atherosclerosis. **Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.** **103**:95-104, 1992.

- JANDER, S.; SITZER, M.; SCHUMANN, R.; *et al.* Inflammation in high-grade carotid stenosis: a possible role for macrophages and T cells in plaques destabilization. **Stroke**, **29**:1625-30, 1998.
- KALAYOGLU, M.V.; BYRNE, G.I. A *Chlamydia pneumoniae* component that induces macrophage foam cell formation is chlamydial lipopolysaccharide. **Infec. Immun.** **66**:5067-72, 1998.
- KEY, N.S.; VERCELLOTTI, G.M.; WINKELMANN, J.C.; *et al.* Infection of vascular endothelial cells with herpes simplex virus enhances tissue factor activity and reduces thrombomodulin expression. **Proc. Natl. Acad** **87**:7095-99, 1990.
- KLEEMOLA, M.; SAIKKU, P.; VASAKORPI, R.; *et al.* Epidemics of pneumonia caused by TWAR. **J. Infect. Dis.** **157**:230-36, 1988.
- KLOTZ, O.; MANNING, M. Fatty streaks in the intima of arteries. **J. Pathol. Bacteriol.** **16**:211-20, 1912.
- KODAMA, T.; FREEMAN, M.; ROHRER, L.; *et al.* Type I macrophage scavenger receptors contains alpha-helical and collagen-linked coiled coils. **Nature**, **343**:531-5, 1990.
- KOVACS, A.; WEBER, M.; BURNS, L.; *et al.* Cytoplasmic sequestration of p53 in cytomegalovirus-infected human endothelial cells. **Am. J. Pathol.** **149**:1531-39, 1996.
- KRAGEL, A.H.; REDDY, S.G.; WITTES, J.T.; *et al.* Morphometric analysis of the composition of the atherosclerotic plaques in the four major epicardial coronary arteries in acute myocardial infarction and in sudden coronary death. **Circulation**, **80**:1747-56, 1989.
- KUSHNER, I. Semantics, inflammation, cytokines and common sense. **Cytok. G. Fact. Rev.** **9**: 191-96, 1998.
- KUVIN, J.T.; KIMMELSTIEL, C.D. Infectious causes of atherosclerosis. **Am. Heart J.** **137**:216-26, 1999.

- LAURILA, A.; BLOIGU, A.; NAYHA, S., *et al.* Association of Helicobacter infection with elevated serum lipids. **Atherosclerosis** **142**:207-10, 1999.
- LEAVY, J.; WIESS, M.; BORRICO, S.; *et al.* Angiographic progression of coronary artery disease and the development of myocardial infarction. **J. Am. Coll. Cardiol.** **12**:56-62, 1988.
- LEINONEN, M.; SAIKKU, P. Evidence for infectious agents in cardiovascular disease and atherosclerosis. **The Lancet** **2**:11-17, 2002.
- LEUWEN, M.; VAN RIJSWIJK, M.H. Acute phase proteins in monitoring of inflammatory disorders. **Baill. Clin. Rheumatol.** **8**:531-52, 1994.
- Libby P, Sukhova G, Lee RT, *et al.* Molecular biology of atherosclerosis. **Int J Cardiol** **62(suppl 2)**:523-9, 1997.
- LIBBY, P.; SCHOENBECK, U.; MACH, F.; *et al.* Current concepts in cardiovascular pathology: the role of LDL cholesterol in plaque rupture and stabilization. **Am. J. Med.** **104**(2):14-18, 1998.
- LIUZZO, G.; BIASUCCI, L.M.; GALLIMORE, J.R.; *et al.* The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina **N. Engl. J. Med.** **33**(17): 417-24, 1994.
- LOTUFO PA. Epidemiologia das doenças cardíacas no Brasil: histórico, situação atual e proposta de modelo teórico. **Rev. Soc. Cardiol. Est. S. P.** **5**:541-7, 1996.
- LUSCINSKAS, F.W.; CYBUISKY, M.I.; KIELY, J.M.; *et al.* Cytokine-activated human endothelial monolayers support enhanced neutrophil transmigration via a mechanism involving both endothelial-leucocyte adhesion molecule-1 and intracellular adhesion molecule-1. **J. Immunol** **146**:1617, 1991
- MARON, M.; SUKHOVA, G.; FARIA, A.F.; *et al.* Mucosal administration of heat shock protein-65 decreases atherosclerosis and inflammation in aortic arch of low-density lipoprotein receptor-deficient mice. **Circulation** **106**:1708-15, 2002.

MATRISIAN, L.M. The matrix degrading metalloproteinases. **Bioessays** **14**:455-63, 1992.

MAYR, M.; METZLER, B.; KIECHL, S., *et al.* Endothelial cytotoxicity mediated by serum antibodies to heat shock proteins of *Escherchia coli* and *Chlamydia pneumoniae*. Immune reactions to heat shock proteins as a possible link between infection and atherosclerosis. **Circulation** **99**:1560-66, 1999.

MAYR, M.; KIECHL, S.; WILLEIT, J.; *et al.* Infections , immunity, and atherosclerosis: associations of antibodies to *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, and *Cytomegalovirus* with immune reactions to heat-shock protein 60 and carotid or femoral atherosclerosis. **Circulation** **102**(8):833-39, 2000

MELNICK, J.L.; PETRIE B.L.; DREESMAN, G.R.; *et al.* Cytomegalovirus antigen within human arterial smooth muscle cells. **Lancet** **2**:644-47, 1983.

MELNICK, J.; DRESSMAN, G.; MCCOLLUM, *et al.* Cytomegalovirus antigen within human arterial smooth muscle cells. **Lancet** **2**:644-47, 1987.

MELNICK, J.; ADAM, E.; DEBAKEY, M. Possible role of cytomegalovirus in atherogenesis. **JAMA** **263**:2204-7, 1990.

MENDALL, M.A.; GOGGIN, P.M.; MOLINEAUX, *et al.* Relation of *Helicobacter pylori* infection and coronary heart disease. **Br Heart J**, **71**:437-439, 1994.

MIRAGLIOTTA, G.; DEL PRETE, R. Mosca, A. *Helicobacter pylori* infection and coronary heart disease. **Lancet** **344**:751, 1994

MORA, R.; LUPU, F.; SIMIONESCU, N. Prelesional events in atherogenesis. Colocalization of apolipoprotein B, unesterified cholesterol and extracellular phospholipid liposomes in the aorta of hyperlipidemic rabbit. **Atherosclerosis**, **63**:143-54, 1987.

MORAIS, N.S. Aterosclerose. In: Porto, C.C. Doenças do Coração, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 1^a Ed., 1998, p.568-75.

- MORENO, P.R.; FALK, E.; PALACIOS, I.F.; *et al.* Macrophage infiltration in acute coronary syndromes: implications for plaque rupture. **Circulation** , **90**:775-8, 1994
- NETO, J.R.F.; CHAGAS, A.C.P.; LUZ, P.L. Síndromes Coronárias: Avanços na fisiopatologia. **Rev. Soc. Cardiol. Est. S. P.** **1**:100-10, 1999.
- NEUMMAN, F.J.; KSATRATI, A.; MIETHKE, T. POGATSA-MMURAY, G.; SEYGARTH, M.; SCHOMIG, A. Previous cytomegalovirus infection and risk of coronary thrombotic events after stent placement. **Circulation** **357**:2085-89, 2001.
- OPPENHEIM, J.J.; KOVACS, R.J.; MATSUSHIMA, K.; *et al.* There is more than one interleukin-1. **Immunol. Today** **7**:45-56, 1986.
- OSLER, W. Diseases of the arteries. In: Osler W, Editor. **Modern medicine: its practice and theory**. Philadelphia: Lea an Febiger; p. 429-47, 1908.
- PASCERI, V.; CAMMAROTA, G.; PATTI, G.; CUOCO, L.; *et al.* Association of virulent *Helicobacter pylori* strains with ischemic heart disease. **Circulation** **97**:1675-79, 1998.
- PATEL, P.; MENDALL, M.A.; CARRINGTON, D.; *et al.* Association of *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* infection with coronary heart disease and risk factors. **BMJ** **311**:711-14, 1995.
- PATERSON, J.C.; COTTRAL, G.E. Experimental coronary sclerosis: lymphomatosis as a cause of coronary sclerosis in chickens. **Arch. Pathol.** **49**:699-709, 1950.
- PARTHASARATHY S. Modified Lipoproteins in the Pathogenesis of Atherosclerosis. **Austin: R.G. Landes**, pp.91-119, 1994.
- PARTHASARATHY S. Mechanism(s) of cell-mediated oxidation of low density lipoprotein. In: Nohl H, Esterbauer H, Evans CR, eds. *Free Radicals in the Environment, Medicine and Toxicology*. London: **Richelieu Press**, p.163-79, 1994.

PEREZ, G.I.; WILKIN, S.S.; DECKER, M.D.; *et al.* Soroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in couples. **J. Clin. Microbiol.** **29**:642-44, 1991.

PRADO, M. L. Mortalidade por doenças do aparelho circulatório no estado de Santa Catarina. Florianópolis, 1989. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina.

PRASSAD, A.; ZHU, J.; HALCOX, J.P.J.; *et al.* Predisposition to atherosclerosis by infections role of endothelial dysfunction. **Circulation** **106**:184-90, 2002.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAYOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiol. Molec. Biol. Rev.** **62**:1094-1156, 1998.

REBUZZI, A.G.; QUARANTA, G.; LIUZZO, G.; *et al.* Incremental prognostic value of serum levels of troponin T and C-reactive protein on admission in patients with unstable angina pectoris. **Am. J. Cardiol.** **82**:715-19, 1998.

RICHARDSON, P.D.; DAVIES, M.J.; BORN, G.V.R. Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. **Lancet** **2**:941-4, 1989

RIDKER, P.M.; HENNEKENS, C.H.; JOHNSON, B.R.; *et al.* Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. **Lancet** **351**:88-92, 1988.

RIDKER, P.; KUNDSIN, R.B.; STAMPFER, M.J.; *et al.* Prospective study of chlamydia pneumoniae IgG seropositivity and risk of future myocardial infarction. **Circulation** **99**:1161-64, 1999.

RIDKER, P.M.; RIFAI, N.; STAMPFER, M.J.; *et al.* Plasma concentration of Interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. **Circulation** **101**(15): 1767-72, 2000.

- ROBERTS WC. Preventing and arresting coronary atherosclerosis. **Am. Heart J.** **130**: 580-600, 1995.
- ROKITANSKY C.A. **Manual of pathological anatomy**. London: S. Ydenham Society, 1852; p.261; **Vol. 4**
- ROITT, I; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 4^a ed. Times Mirror Int. Pub. Lim. S.Paulo, 1997.
- ROSENSCHEIN, U.; ELLIS, S.G.; YAKUBOV, S.J. *et al.*. Histopathologic correlates of coronary lesion angiographic morphology: lessons from a directional atherectomy experience. **Coron Artery Dis**, **3**:953-61, 1992
- ROSS, R.; GLOMSET, J.A. The pathogenesis of atherosclerosis. **N. Engl. J. Med.** **295**:369-77, 1976.
- ROSS R. The pathogenesis of atherosclerosis - an update. **N. Engl. J. Med.**, **58**:207-12, 1986.
- ROSS, R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. **N. Engl. J. Med.** **340**:115-26, 1999.
- RUAWS, E.A.J.; TYTGAT, G.N.J. Cure of duodenal ulcer associated with eradication of *Helicobacter pylori*. **Lancet** **335**:1233-35, 1990.
- RUPPRECHT, H.J.; BLANKENBERG, S.; CHRISTOPH, B.; *et al.* Impact of viral and bacterial infectious burden on long-term prognosis in patients with coronary artery disease. **Circulation** **104**:25-31, 2001.
- SAIKKU, P.; LEINONEN, M.; MATTILA, K.; *et al.* Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. **Lancet**, **2**:983-986, 1988.
- SCHWENKE DC, CAREW TE. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol fed rabbits: Focal increases in arterial LDL concentrations precede development of fatty streak lesions. **Arteriosclerosis** **9**:895-907, 1989.

SEDMAK, D.D.; KNIGHT, D.A.; VOOK, N.C.; *et al.* Divergent patterns of ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 expression on cytomegalovirus-infected endothelial cells. **Transplantation** **58**:1379-85.

SMITH, P.D.; SAINI, S.S.; RAFFELD, M.; *et al.* Cytomegalovirus induction of tumor necrosis factor-alpha by human monocytes and mucosal macrophage. **J. Clin. Invest.** **90**:1642-48, 1992

SORLIE, P.; NIETO, F.J.; ADAM, E.; *et al.* A prospective study of *Cytomegalovirus*, *Herpes Simplex virus-1* and coronary heart disease: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. **Arch. Int. Med.** **160**(13):2027-32, 2000.

SPEIR, E.; MODALI, R.; HUANG, E.S.; *et al.* Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. **Science** **265**:391-94, 1994.

STARY, H.C.. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. **Arteriosclerosis** **99**(suppl I): I19-I32, 1989.

STONE, A.F.M.; MENDALL, M.A.; KASKI, J.C.; *et al.* Effect of treatment for *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* on Markers of inflammation and cardiac events in patients with acute coronary syndromes. **Circulation** **106**:1219-23, 2002.

TAYLOR-ROBINSON, D. Infections due to species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma*: an update. State of the art clinical article. **Clin. Infect. Dis.** **23**:671-84, 1986.

TUUMINEN, T.; VARJO, S.; INGMAN, H.; *et al.* Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* in a healthy finnish population as analyzed by quantitative enzyme immunoassays (EIAs). **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** **7**:734-38, 2000.

VAN DER WAL, A.C.; BECKER A.E.; VAN DER LOOS C.M.; *et al.* Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. **Circulation**, **89**:36-44, 1994

VIRCHOW R. **Phlogose und thrombose in gefasssystem, gesammelte a bhandlungen zur wissenschaftlichen medicin.** Frankfurt am Main, Germany: Meidinger Sohn, 1856; p.458.

XU, Q.; WICK, G. The role of heat shock proteins in protection and pathophysiology of the arterial wall. **Mol. Med. Today** **2**:372-79, 1996.

YAMASHIROYA, H.M.; GHOSH, L.; YANG, R.; *et al.* Herpesviridae in the coronary arteries and aorta of young trauma victims. **Am. J. Pathol.** **130**:71-79, 1988.

Ward, M.E.: The immunobiology and immunopathology of chlamydial infections. **APMIS** **103**:769-96, 1995.

WHINCUP, P.H.; MENDALL, M.A.; PERRY, I.J.; *et al.* Prospective relations between *Helicobacter pylori* infection, coronary heart disease, and stroke in middle aged men. **Heart** **75**(6):568-572, 1996.

WITZTUM JL, STEINBERG D. Role of oxidized low density proteins in atherogenesis. **J. Clin. Invest.** **88**:1785-92, 1991.

WITZTUM JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. **Lancet** **344**:793-5, 1994.

WYNGAARDEN, J.B.; SMITH, L.H.; BENNETT, J.C. **CECIL-Textbook of Medicine.** 19 ed., 1992.

ZHU, J.; QUYYUMI, A.A.; NORMAN, J.E.; *et al.* Effects of total pathogen burden on coronary artery disease risk and C-reactive protein levels. **Am. J. Cardiol.** **85**:140-46, 2000.

8 - ANEXO

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS BASAIS DE PACIENTES COM ANGINA INSTÁVEL, ANGINA ESTÁVEL E GRUPO CONTROLE EM RELAÇÃO AS VARIÁVEIS SOCIOECONÔMICAS E DEMOGRÁFICAS

GRUPOS	AI n=20		AE n=20		C n=20		Grupo Total n=60		P
	n	%	n	%	n	%	n	%	
SEXO									
Sexo Masculino	14	70	13	65	13	65	40	66,7	NS
Sexo Feminino	6	30	7	35	7	35	20	33,3	NS
RACIAIS									
Branco	19	95	20	100	17	85	56	93,3	NS
ESCOLARIDADE									
Escolaridade (nível fundamental)	17	85	19	95	14	70	50	83,3	NS
PROFISSÃO									
Profissão (do lar)	3	15	4	20	4	20	11	18,3	NS

NOTA: Pacientes avaliados durante 1999 e 2000, no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina.

AI – angina instável

NS – não significativo

AE – angina estável

C – Controles

TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS BASAIS DE PACIENTES COM ANGINA INSTÁVEL, ANGINA ESTÁVEL E GRUPO CONTROLE EM RELAÇÃO A FATORES DE RISCO PARA DOENÇAS CARDIOVASCULARES

GRUPOS	AI n=20		AE n=20		C n=20		Grupo Total n=60		P
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Dislipidemias	10	50	13	65	9	45	32	53,3	NS
Tabagismo	10	50	7	35	3	15	20	33,3	NS
Hipertensão Arterial Sistêmica	8	40	10	50	14	70	36	60	NS
Diabetes Melito	6	30	3	15	4	20	13	21	NS
Sedentarismo	18	90	17	85	16	80	51	85	NS
Obesidade (IMC)	13	65	13	65	19	95	45	75	NS
História Familiar de DAC	7	35	7	35	8	40	22	36,7	NS

NOTA: Pacientes avaliados durante 1999 e 2000, no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina.

AI – angina instável

NS – não significativo

AE – angina estável

DAC – doença arterial coronariana

C – Controles

IMC – índice de massa corpórea

TABELA 3 – CARACTERÍSTICAS BASAIS DE PACIENTES COM ANGINA INSTÁVEL, ANGINA ESTÁVEL E GRUPO CONTROLE EM RELAÇÃO A RESULTADOS DE EXAMES LABORATORIAIS

GRUPOS	AI n=20	AE n=20	C n=20	A/B	A/C	B/C
CARACTERÍSTICAS	média \pm dp	média \pm dp	média \pm dp			
Colesterol total (mg/dl)	229,2 \pm 48,9	205,8 \pm 46,0	202,3 \pm 33,5	NS	NS	NS
LDL-colesterol (mg/dl)	153,2 \pm 45,3	142,2 \pm 42,4	137,1 \pm 36,5	NS	NS	NS
HDL-colesterol (mg/dl)	46,0 \pm 15,0	40,2 \pm 7,7	45,5 \pm 14,5	NS	NS	NS
Triglicerídeos (mg/dl)	183,2 \pm 135,3	140,0 \pm 72,9	91,7 \pm 50,5	NS	S	NS
Glicemia (mg/dl)	136,8 \pm 68,2	109,0 \pm 43,1	104,9 \pm 26,9	NS	NS	NS

NOTA: Pacientes avaliados durante 1999 e 2000, no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina.

AI – angina instável

AE – angina estável

C – Controles

A/B – diferença entre os grupos A e B

A/C – diferença entre os grupos A e C

B/C – diferença entre os grupos B e C

NS – não significativo

S – significativo (P<0,05)

9 - APÊNDICE

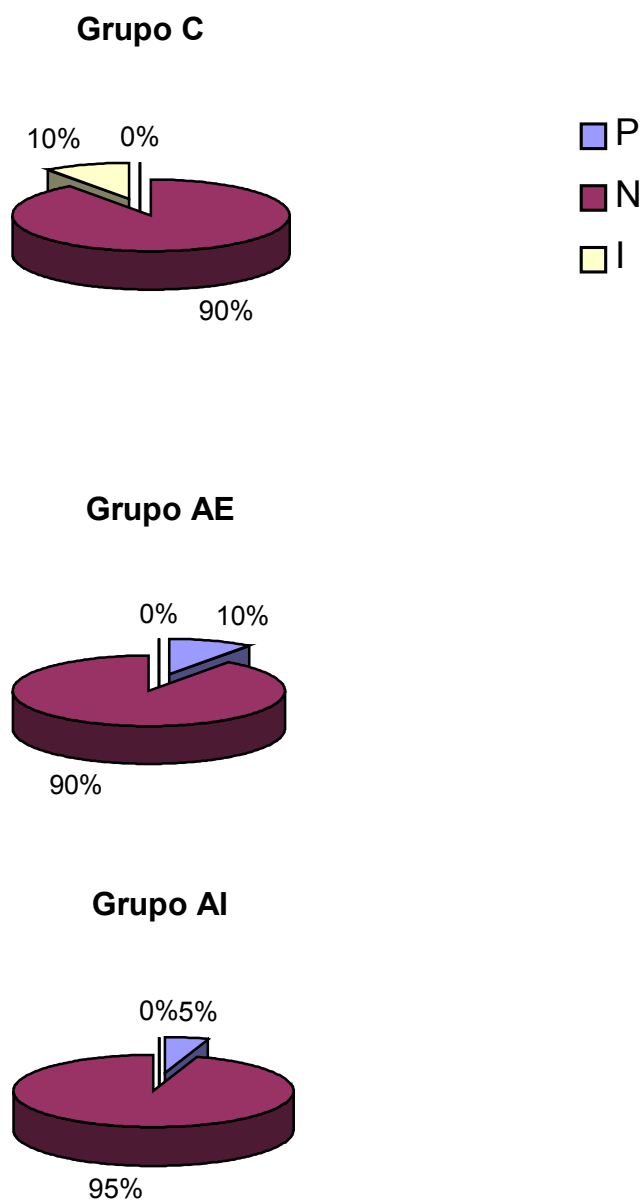


Figura 1: Positividade de anticorpos IgM contra HSV-1 nos diferentes grupos.

C = controle; AE = angina estável; AI = angina instável

P = positivo; N = negativo; I = indeterminado

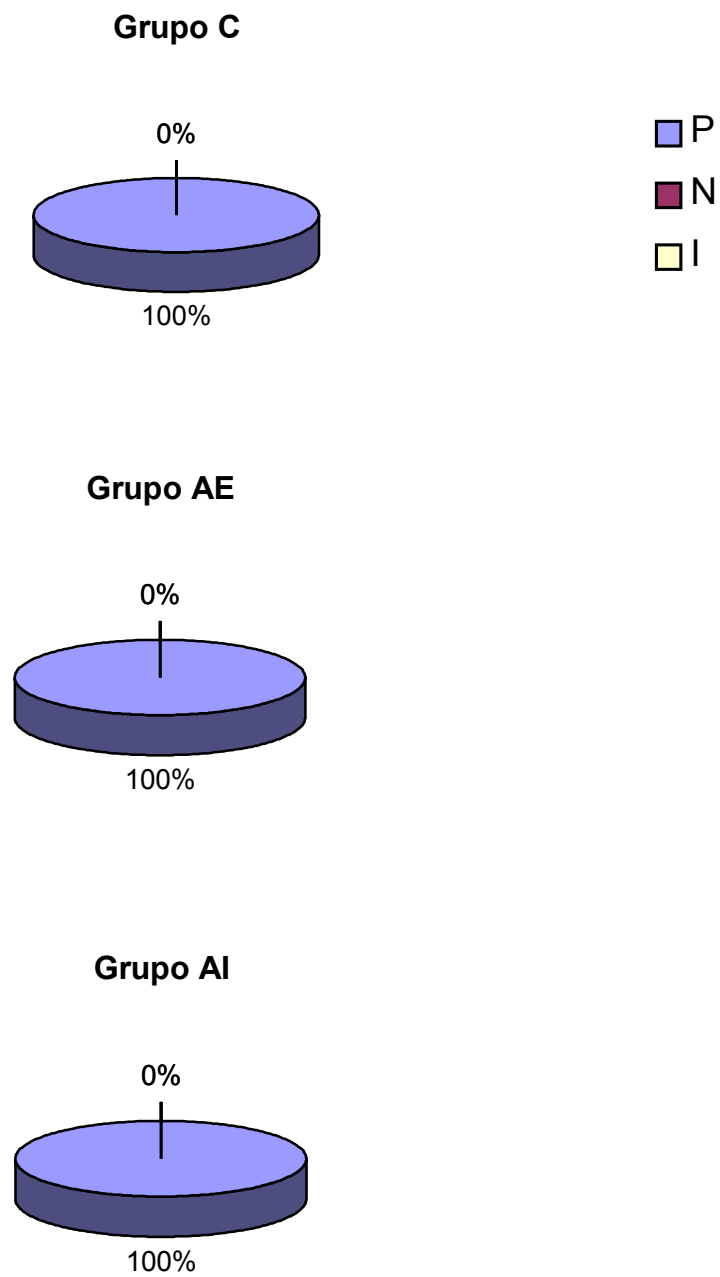


Figura 2: Positividade de anticorpos IgG contra HSV-1 nos diferentes grupos.

C = controle; AE = angina estável; AI = angina instável

P = positivo; N = negativo; I = indeterminado

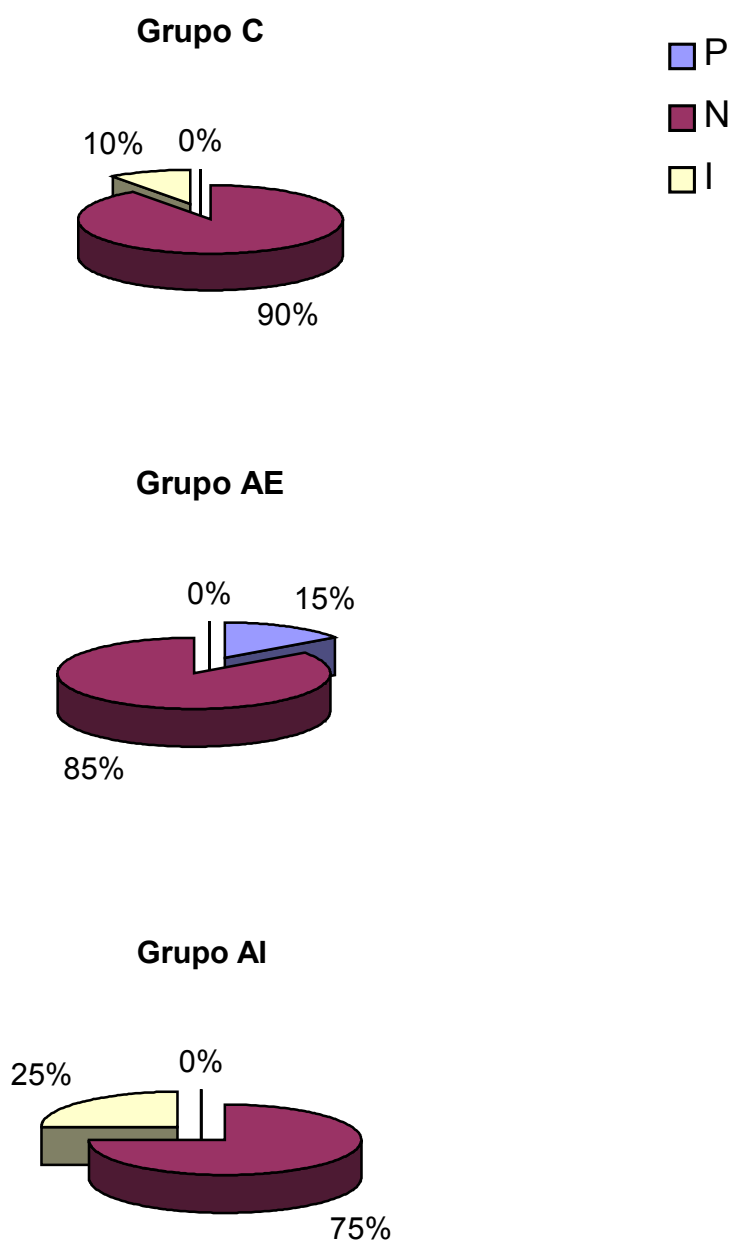


Figura 3: Positividade de anticorpos IgM contra CMV nos diferentes grupos.

C = controle; AE = angina estável; AI = angina instável

P = positivo; N = negativo; I = indeterminado

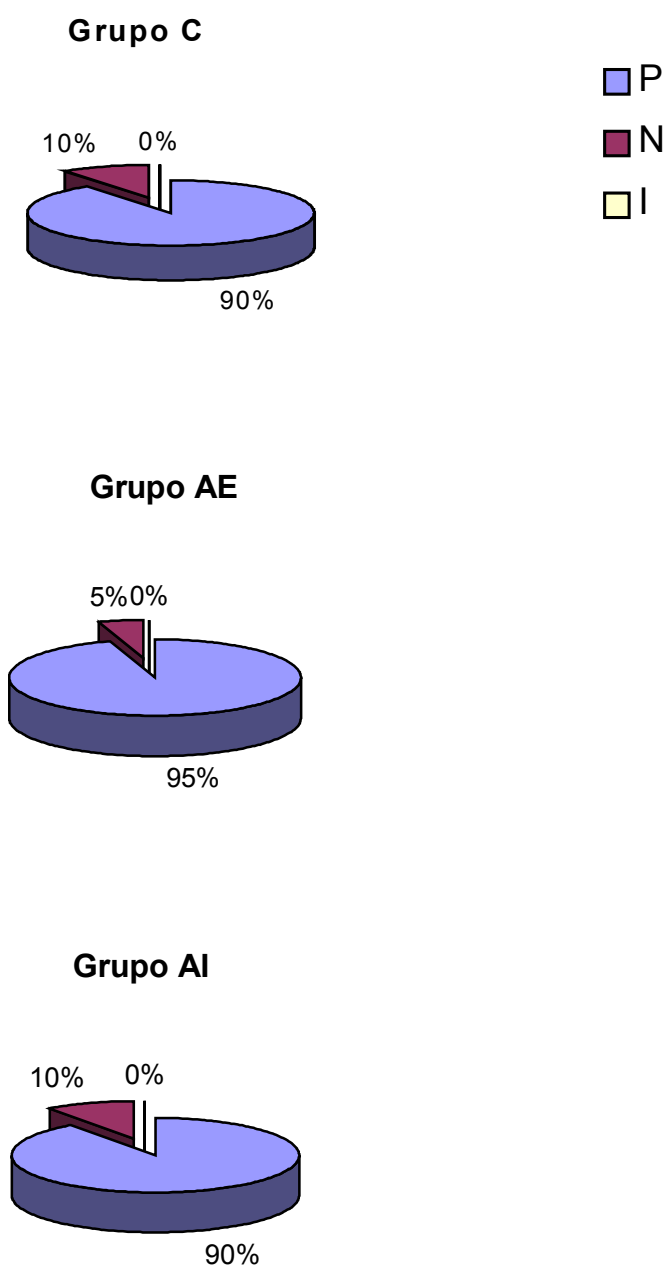


Figura 4: Positividade de anticorpos IgG contra CMV nos diferentes grupos.

C = controle; AE = angina estável; AI = angina instável

P = positivo; N = negativo; I = indeterminado

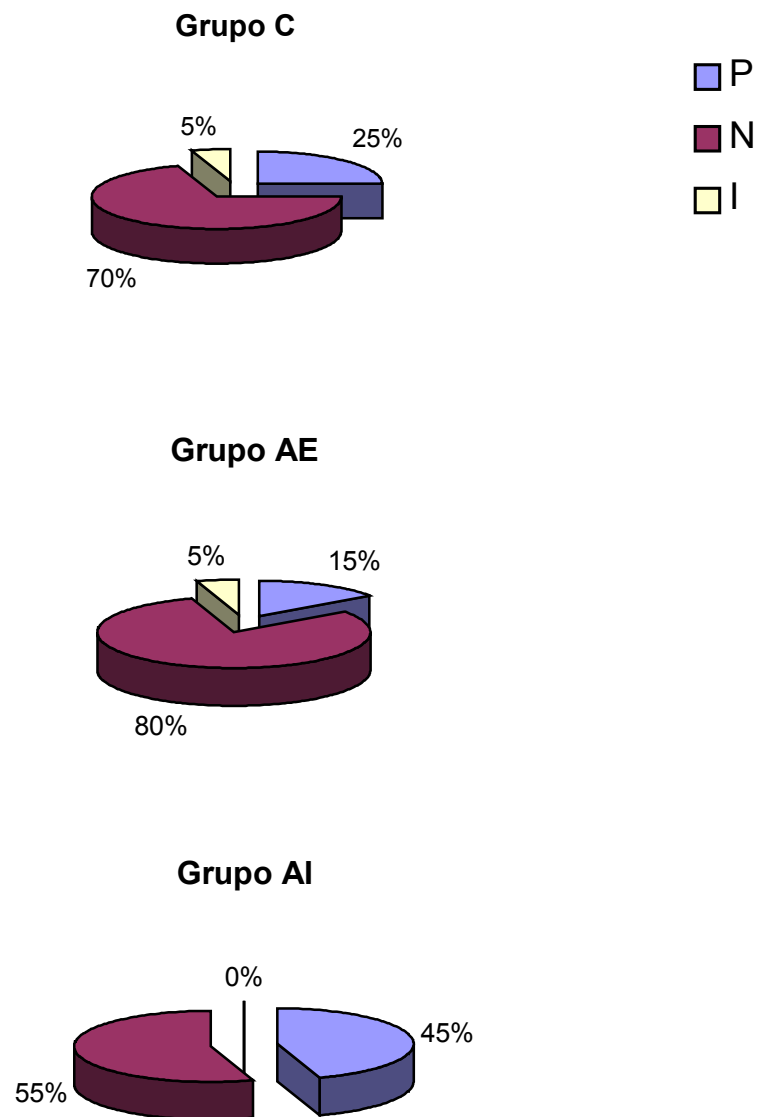


Figura 5: Positividade de anticorpos IgM contra *H. pylori* nos diferentes grupos.

C = controle; AE = angina estável; AI = angina instável

P = positivo; N = negativo; I = indeterminado

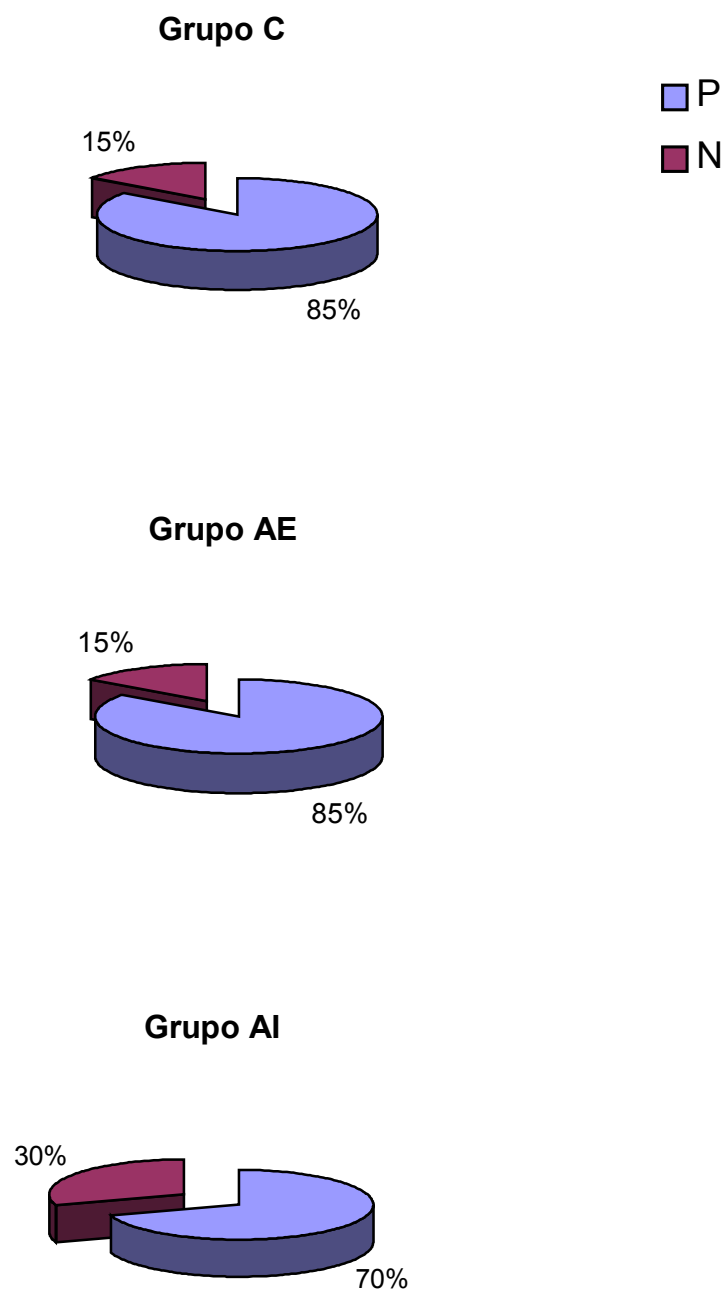


Figura 6: Positividade de anticorpos IgG contra *H. pylori* nos diferentes grupos.

C = controle; AE = angina estável; AI = angina instável

P = positivo; N = negativo; I = indeterminado

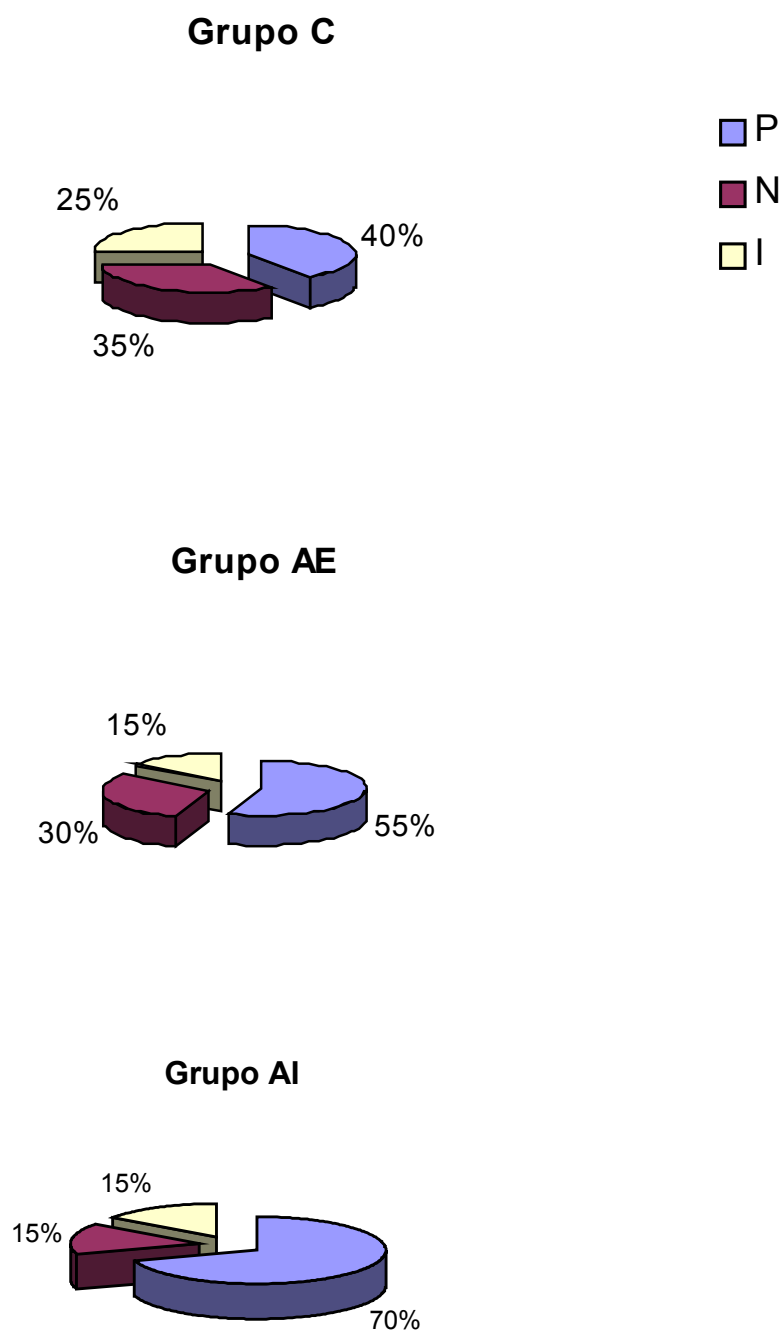


Figura 7: Positividade de anticorpos IgG contra *C. pneumoniae* nos diferentes grupos.

C = controle; AE = angina estável; AI = angina instável

P = positivo; N = negativo; I = indeterminado

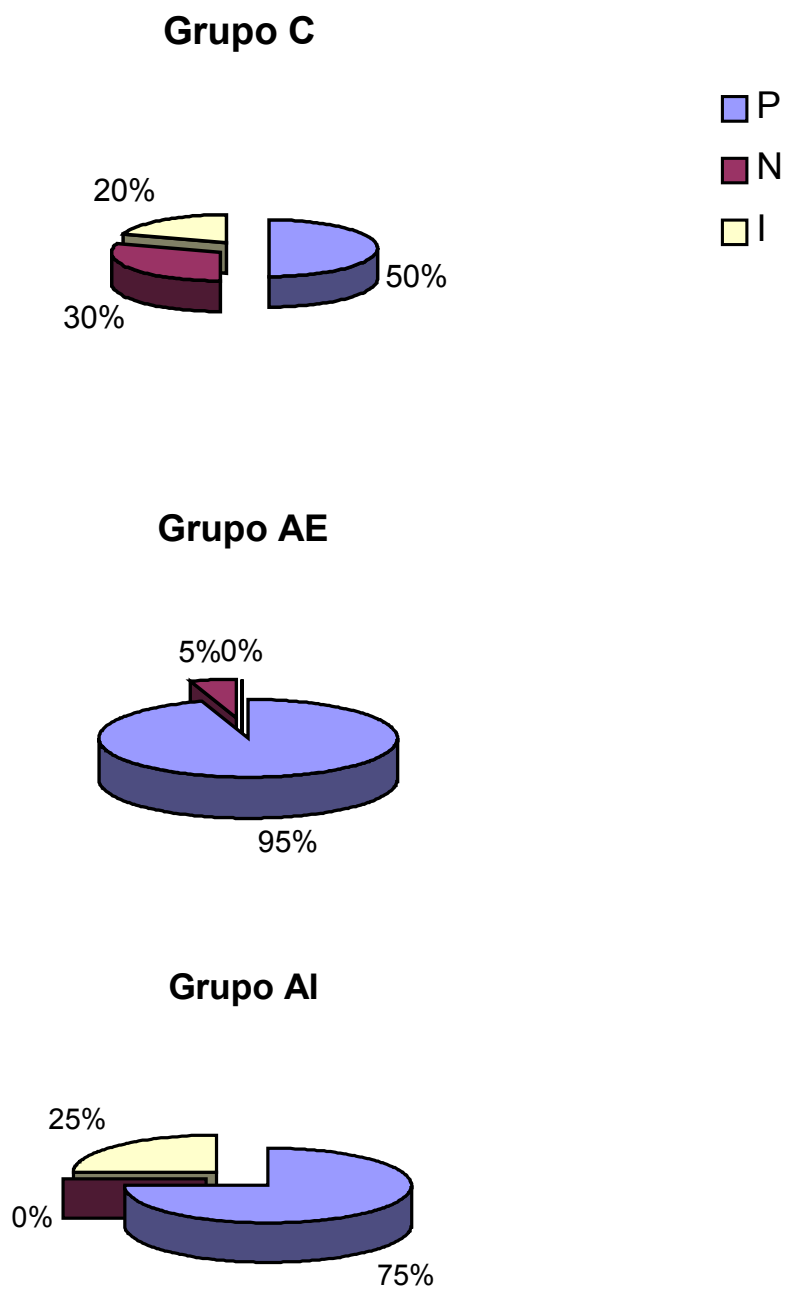


Figura 8: Positividade de anticorpos IgG contra *M. pneumoniae* nos diferentes grupos.

C = controle; AE = angina estável; AI = angina instável.

P = positivo; N = negativo; I = indeterminado.